

Aus der Klinik für Innere Medizin II der Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie

Direktor: Professor Dr. med. habil. Georg Lamprecht

Forschungslabor für Gastroenterologie, Forschungsgruppe experimentelle Pankreatologie

Leiter: Professor Dr. med. habil. Robert Jaster

**In vitro Studien zur Rolle dendritischer Zellen im MRL/MpJ-Mausmodell der chronischen
Pankreatitis**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Erik Volmer, geb. am 22.12.1990 in Neubrandenburg

Eingereicht am: 16.03.2018 in Rostock

Verteidigt am: 04.12.2018 in Rostock

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Robert Jaster
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Saleh Ibrahim
3. Gutachter: Frau PD Dr. rer. nat. et med. habil. Kirsten Peters

In Liebe meinen Eltern und Großeltern

In Gedenken an Horst Teschke und Hans Eschen

1	Einleitung	1
1.1	Stand der Forschung	2
1.1.1	Pankreatitiden	2
1.1.2	Chronische Pankreatitis	4
1.1.3	Autoimmune Pankreatitis (AIP).....	6
1.1.3.1	Eine eigene Entität, die es zu unterscheiden gilt.....	6
1.1.3.2	Pathologie und Subtypen.....	7
1.1.3.3	Epidemiologie	8
1.1.3.4	Pathophysiologie – Zusammenspiel zellulärer und humoraler Faktoren	9
1.1.3.4.1	Potenzielle humorale Faktoren	9
1.1.3.4.2	Potenzielle zelluläre Faktoren – und die Rolle dendritischer Zellen (DCs) in der (Auto-)Immunität	10
1.1.3.4.3	Der MRL/MpJ-Mausstamm als geeignetes Mausmodell.....	14
1.1.3.5	Aktuelles Konzept der Erkrankung – DCs und Tregs.....	15
1.2	Ziel der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Mausstämme/ Mausmodelle der autoimmunen Pankreatitis	19
2.2	Präparation, Isolierung und Kultivierung dendritischer Zellen (DCs) aus dem Knochenmark	20
2.2.1	Präparation der Mäuse	20
2.2.2	Kultivierung dendritischer Zellen (DCs) – Tag 0	21
2.2.2.1	Tag 3.....	21
2.2.2.2	Tag 6 und 8	22
2.2.2.3	Tag 9.....	22
2.2.2.4	Tag 10.....	22
2.3	BrdU-Assay.....	23
2.4	Durchflusszytometrie - Fluorescence-activated cell sorting (FACS).....	23

2.5	Immunoassays – Detektionsverfahren zur Quantifizierung humoraler Faktoren in Zellmedien	25
2.5.1	Interleukin (IL)-12 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	25
2.5.2	Biolegend's LEGENDplex™ Assay	26
2.6	RNA-Isolation	28
2.7	DNase-Verdau und Qualitätskontrolle der RNA	28
2.8	Reverse Transkription	30
2.9	TaqMan-PCR (qRT-PCR)	31
2.10	Statistik	32
3	Ergebnisse	33
3.1	BrdU	33
3.2	FACS	35
3.3	IL-12 ELISA und LEGENDplex™-Assays.....	42
3.4	qRT-PCR	45
4	Diskussion	48
4.1	Aus MRL/MpJ-Mäusen in vitro generierte cDCs weisen einen reiferen, aktiven Phänotyp auf.....	48
4.2	Zytokin- und Chemokin-Expressionsprofile aktivierter cDCs	51
4.3	Genexpressionsprofile aktivierter cDCs und ihre funktionellen Implikationen	53
5	Integrative Betrachtung und Ausblick	56
5.1	MRL/MpJ-cDCs im Kontext der (Auto)Immunität sowie der AIP	56
5.2	Ausblick.....	60
6	Zusammenfassung	61
7	Thesen	63
	Literaturverzeichnis	64
	Abkürzungsverzeichnis	83
	Abbildungsverzeichnis	87
	Anhang	88

1 Einleitung

Die Bauchspeicheldrüse (*Pankreas*) ist ein seröses Drüsenorgan des menschlichen Körpers mit essenziellen Funktionen im Stoffwechsel und der Verdauung. Das mit seinen circa 80 g Gewicht retroperitoneal gelegene Pankreas lässt sich makroanatomisch in 3 Teile gliedern: Diese sind der in der c-förmigen Schleife des Zwölffingerdarms (*Duodenum*) liegende Pankreaskopf (*Caput*) sowie der Pankreaskörper (*Corpus*) und der Pankreasschwanz (*Cauda*), der bis unmittelbar an den Milzhilus im linken Oberbauch reicht.

Histologisch betrachtet, vereint das Pankreas in sich eine exokrine und eine endokrine Drüsenfunktion. Die Hauptmasse des Drüsengewebes bildet dabei der exokrine Anteil, der aus den azinären und dukталen Zellen besteht. Die Azinuszellen synthetisieren etwa 20 verschiedene Verdauungs(pro)enzyme. Die wichtigsten dieser Enzyme sind die für den Kohlenhydratverdau essenzielle Amylase, die Fette spaltende Lipase sowie die Proteasen Trypsin und Chymotrypsin. Auf neurale (*N. vagus*) und hormonelle (durch Cholezystokinin) Reize hin werden die meisten dieser Enzyme, mit Ausnahme der Amylase und Lipase, in ihren inaktiven Vorstufen als Proenzyme (Zymogene) in das Gangsystem (*Ductus pancreaticus*) sezerniert und erst im Duodenum durch Enterokinasen aktiviert. Die Enteropeptidase katalysiert dabei die proteolytische Prozessierung von Trypsinogen in seine enzymatisch aktive Form Trypsin. Dieses wiederum stößt auf gleichem Wege die Aktivierungskaskaden seines eigenen Propeptids und die weiterer Proenzyme – wie Chymotrypsinogen, Procarboxy- und Proaminopeptidasen – an.

Die dukталen Zellen sezernieren – stimuliert durch Sekretin – Natriumbikarbonat, Kationen (z.B. Ca^{2+}), Anionen (z.B. Cl^-), Wasser und Muzine, die zusammen mit den azinären Enzymen das alkalische Pankreassekret in einem Tagesvolumen von 1,5 bis 3 Liter bilden.

Die endokrinen, hormonproduzierenden Zellen des Pankreas machen dagegen lediglich circa 2 % der Organmasse aus. Sie liegen dicht umgeben von zahlreichen Blutkapillaren in kleinen Gruppen – den sogenannten Langerhans-Inseln – im exokrinen Gewebsanteil verstreut. Diese Inseln vereinigen in sich spezialisierte hormonproduzierende Zellverbände. Sie bestehen zu etwa 60 – 70 % aus insulinproduzierenden Zellen, den B- oder auch β -Zellen und zu 20 – 25 % setzen sie sich aus glukagonproduzierenden Zellen, den A- oder α -Zellen, zusammen. Die übrigen Zellen bilden das Somatostatin (D- oder δ -Zellen) oder das pankreatische Polypeptid (PP-Zellen). Das Pankreas ist somit an der Funktion der Verdauungsvorgänge beteiligt und maßgeblich in den Regelkreis des Glukosestoffwechsels involviert.

Es wird deutlich, dass Erkrankungen des Pankreas sowohl Störungen der Verdauung als auch eine Dysregulation des Hormonhaushalts hervorrufen können. Vor allem Entzündungen des Organs

(Pankreatitiden), aber auch Neoplasien bis hin zum Pankreaskarzinom gehören dabei zu den bedeutsamen Pankreaserkrankungen und können bei progredienten Verläufen von schweren systemischen Komplikationen begleitet werden. Alle relevanten Erkrankungen, wie die akuten (AP) und chronischen (CP) Pankreatitiden sowie das Pankreaskarzinom (PC), stellen dabei große therapeutische Herausforderungen dar. Das PC weist zudem noch eine sehr hohe Letalität auf. Die CP und das PC sind beide unabhängig von ihrer Ätiologie durch eine massive und durch fehlregulierte Wundheilungsprozesse ausgelöste Organfibrose charakterisiert. Eine besondere Rolle spielt außerdem die überschüssige Produktion extrazellulärer Matrix (EZM), die aktiv an der Krankheitsprogression beteiligt ist [27, 58].

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Pankreatitiden

Die Pankreatitis lässt sich auf Grund klinischer und morphologischer Kriterien in eine akute und eine chronische Verlaufsform unterteilen.

Die AP gehört mit einer Inzidenz von 13-45/100.000 zu den häufigeren Krankheitsbildern der Gastroenterologie. Die Sterblichkeit bei dieser Erkrankung wird je nach Schweregrad zwischen 2 % (milde, ödematöse Pankreatitis) und 15 % (schwere, nekrotisierende Pankreatitis) angegeben. Die größte Gefahr liegt, wie bei einer Vielzahl internistischer Krankheitsbilder, in der Entstehung einer unkontrollierten systemischen Inflammation („*systemic inflammatory response syndrome*“, SIRS) und einem damit einhergehenden Multiorganversagen [122, 138, 141].

Bei der Entwicklung einer AP kommt es meist zu einer ethyltoxischen primären Schädigung des Sekretionsapparates der azinären Zellen. Die durch den Zellschaden bedingte Freisetzung von vor allem lipo- und proteolytisch wirksamen Pankreasenzymen kann zu einem Selbstverdau des Organs mit Ödemen, Fettgewebsnekrosen und Blutungen bis hin zur Abszessbildung führen. Vor allem die freigesetzte, Kinine-spaltende Phospholipase A und das Kallikrein können massive Schmerzen und eine starke Vasodilatation mit hämodynamischer Schocksymptomatik herbeiführen, die wiederum einen erneuten Zellschaden des Sekretionsapparates induzieren und somit eine AP unterhalten kann [50].

Zu den häufigsten Ursachen einer AP zählen in erster Linie die Gallenwegserkrankungen (Cholelithiasis mit Stenose der *Papilla Vateri*) und der übermäßige Alkoholkonsum. Seltener Ursachen können eine Hypertriglyzeridämie, bakterielle oder virale Infektionen (z.B. Mumps), eine endokrinologisch bedingte Hyperkalziämie (Hyperparathyreoidismus), Medikamente (Arabinoside, Furosemid, Metronidazol, Tetrazykline, Tamoxifen u. a.) und auch

Traumata (z.B. Sturz auf den Fahrradlenker im Kindesalter) darstellen. Gelegentlich können auch die im Rahmen einer endoskopisch retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP) durchgeführten Manipulationen am Organ als iatrogener Auslöser akuter (post-ERCP) Pankreatitiden wirken. Die seltene idiopathische AP stellt nach Abklärung der aufgeführten Ursachen eine anamnestiche Ausschlussdiagnose dar ^[122, 146]. Unabhängig von ihrer Ätiologie imponieren nahezu alle Formen der AP klinisch mit plötzlich einsetzenden, schweren anhaltenden Oberbauchschmerzen und je nach Schweregrad zudem mit Erbrechen, Fieber und Tachykardie ^[53]. Neben der Einteilung unter morphologischen Gesichtspunkten in eine interstitielle, ödematöse Pankreatitis oder eine nekrotisierende Pankreatitis, erfolgt auch eine Einstufung der Pankreatitiden nach der aktuellen Atlanta-Klassifikation. Diese beinhaltet die Unterscheidung einer leichten akuten Pankreatitis ohne Organversagen und ohne lokale oder systemische Komplikationen von einer mittelschweren akuten Pankreatitis mit vorübergehendem Organversagen (<48 h) oder mit lokalen oder systemischen Komplikationen. Diese Formen können wiederum von einer schweren akuten Pankreatitis mit anhaltendem (>48 h), ein oder auch mehrere Organe betreffenden, Organversagen abgegrenzt werden. Zur Beurteilung des Organversagens können zusätzlich auf Basis des modifizierten Marshall-Scores das respiratorische und kardiovaskuläre System sowie die Nierenfunktion evaluiert werden ^[8].

Darüber hinaus gibt es zahlreiche weitere *Scoring*-Systeme (z.B. *Acute Physiology And Chronic Health Examination* (APACHE)-II-Score, Ranson-Kriterien, *Bedside Index of Severity of Acute Pancreatitis* (BISAP)-Score und *CT-Severity-Index*), die zur Beurteilung des Schweregrades und der Prognose der Erkrankung herangezogen werden können. Zur Berechnung der *Scores* sind laborchemische und vor allem bildgebende diagnostische Verfahren unerlässlich ^[122].

So bildet die Abdomensonographie den essenziellen Bestandteil der initialen bildgebenden Diagnostik von Gallensteinen. Im Gegensatz dazu sind eine CT oder MRT nicht zwingend notwendig ^[137]. Die Pankreasenzymdiagnostik und die Bestimmung weiterer laborchemischer Parameter komplettieren die Untersuchungsmethoden. Bei einer AP genügt jedoch die Bestimmung der Lipase im Serum, wobei die Werte meist über dem 3-fachen der Norm liegen. Andere aufschlussreiche Laborparameter sind u.a. das C-reaktive Protein (CrP, >15 mg/dl) und die Laktatdehydrogenase (LDH), die bei engmaschiger Verlaufskontrolle den Verdacht auf eine nekrotisierende Pankreatitis begründen. Bei Obstruktion des *Ductus choledochus* werden entsprechend cholestaseanzeigende Parameter (γ -Glutamyltransferase (γ -GT), alkalische Phosphatase) erhoben. Beim Vorliegen oder Verdacht eines SIRS sind in kurzen Abständen zweimal nacheinander Sepsis-Parameter (Vitalzeichen, pCO₂, Temperatur, Leukozyten-

Konzentration, Ca^{2+} -Konzentration i.S., Hämatokrit (Hkt) u.a.) zu untersuchen, um eine immunologisch ungünstige Superinfektion des Organismus auszuschließen [39, 50, 122].

Unbehandelte und rezidivierende APs können bei Vorliegen von Komplikationen wie bakteriell infizierter Pseudozysten oder Risikofaktoren wie einem Alkoholabusus chronifizieren.

1.1.2 Chronische Pankreatitis

Die CP stellt eine rezidivierende, entzündlich-fibrosierende Erkrankung des Drüsenparenchyms dar. Sie ist durch den progredienten Umbau und die Einbettung des Organs in eine fibrotische Matrix mit einem nachhaltigen Verlust der exo- und endokrinen Funktionen charakterisiert. Weitere typische Komplikationen dieses Krankheitsbildes stellen das Vorhandensein von Pseudozysten, Stenosen des *Ductus pancreaticus* und des Duodenums mit entsprechender Malnutrition, vaskulären Komplikationen und allen voran chronischen Schmerzen dar. Die Erkrankung ist zudem ein Risikofaktor für die Entstehung eines PC und erhöht das Risiko der Krebsentstehung um das bis zu 16-fache. Das relative Risiko, als Patient mit einer CP ein Krebsleiden zu entwickeln, liegt bei 13,1 %. Bei Patienten mit einem zusätzlichen Nikotinabusus müssen diese Werte noch nach oben korrigiert werden [77, 78, 79].

Die CP hat in Deutschland eine Inzidenz von etwa 23 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr und tritt damit relativ selten auf. Überwiegend sind Männer im Alter zwischen 20 und 40 Jahren betroffen [79].

Gemäß der epidemiologischen Datenlage trägt in bis zu 80 % der Krankheitsfälle ein chronischer Alkoholabusus zur Entstehung der CP bei [25]. Statistisch gesehen erhöhen demnach Personen mit einem täglichen Alkoholkonsum von über 80 g maßgeblich ihr Risiko, in den nächsten 6 – 12 Jahren eine CP zu entwickeln. So erkranken etwa 5 % der chronisch alkoholabhängigen Menschen an einer CP. Weiterhin stellen ein starker Zigarettenkonsum, Infektionen durch *Helicobacter pylori* sowie massives Übergewicht prädisponierende Faktoren zur Entstehung einer CP dar [25, 76]. Die Fülle an Erkenntnissen führte zu dem Vorschlag, Patienten mit einer CP gemäß ihrer Erkrankungsätiologie einzuteilen und eine einheitliche, vergleichbare Klassifikation zur Beurteilung der Krankheitsverläufe zu erstellen. Auf Basis der Datenlage klinischer und experimenteller Forschungsergebnisse wurde die M-ANNHEIM Klassifikation entwickelt. Diese sieht eine ätiologische Einteilung der CP gemäß multipler (M) Risikofaktoren vor und unterscheidet die für die Erkrankung prädisponierenden Faktoren Alkohol (A), Nikotin (N), nutritive Faktoren (N), hereditäre Faktoren (H), Faktoren des efferenten Gangsystems (E), immunologische Faktoren (I) und seltene metabolische Faktoren (M, *miscellaneous/metabolic*). Sie integriert weiterhin alle bildgebenden Untersuchungsmethoden (US, CT, MRT/MRCP, ERCP)

und ermöglicht den klinischen Vergleich der Krankheitsstufen ^[109]. Liegt keine der genannten Ursachen vor, spricht man von einer idiopathischen CP. In dem Maße, wie neue Erkenntnisse zur Ätiologie der CP gewonnen werden, nimmt auch der Anteil an „idiopathischen“ Erkrankungen ab, liegt aber immer noch bei ca. 20 % bzw. 20 – 30 % bei Fällen von rekurrenter AP ^[37].

Zur Rolle genetischer Faktoren in der Pathogenese der CP konnten vor allem Genomuntersuchungen und Stammbaumanalysen genauere Erkenntnisse liefern. Schon 1952 wurde ein genetischer Hintergrund als für wahrscheinlich befunden, als bei der Analyse CP-belasteter Familienstammbäume autosomal-dominante Erbfolgen offensichtlich wurden ^[20]. Alle bis heute entdeckten und mit der Entstehung einer CP in Verbindung gebrachten Gene beeinträchtigen in bestimmter Art und Weise die Zellphysiologie azinärer und duktaler Zellverbände.

Vor allem Mutationen des Gens für das kationische Trypsinogen (*PRSSI*) sind mit der Entstehung hereditärer Pankreatitiden assoziiert. Whitcomb *et al.* identifizierten 1996 neben zwei anderen Forschergruppen (Le Bodic *et al.*, Pandya *et al.*) die wichtigste und bekannteste *R122H*-Genmutation. Sie führt zu einem Anstieg der intrapankreatischen Aktivität und Stabilität des Trypsins auf Grund des Wegfalls autolytisch und degradierend wirksamer Peptidstrukturen (Arginin122 und Valin123). Folgeuntersuchungen zeigten außerdem, dass der Effekt der *R122H*-Mutation nicht nur in einer erhöhten Trypsin-Stabilität, sondern auch in einer erhöhten Zymogen-Stabilität und Autoaktivierung besteht. *PRSSI*-Genmutationen führen demnach kausal zu hereditären Pankreatitiden ^[106, 133, 136].

Eine weitere, die CP begünstigende Mutation, findet sich im *SPINK1*-Gen (vorherrschend *N34 S*-Mutation). Dieses kodiert für den Serin-Protease-Inhibitor vom Kazaltyp-1. Eine Mutation kann zu einem Wegfall (*loss-of-function*-Mutation) der durch *SPINK-1* vermittelten inhibitorischen Wirkungen auf eine frühzeitige, unkontrollierte Enzymaktivierung führen. Dadurch kann die Entwicklung und Progression einer CP begünstigt werden ^[100, 135]. *Loss-of-function*-Mutationen treten weiterhin auch im *PRSS2*-Gen auf, das für das anionische Trypsinogen (zweite Isoform des Trypsins, *PRSS2*) kodiert. Diese Gen-Varianten haben jedoch protektive Eigenschaften in Bezug auf die Entwicklung einer CP. Aberrationen der für Chymotrypsin C (CTRC), den *calcium-sensing receptor* (CASR) und den *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) kodierenden Gene komplettieren das komplexe Zusammenspiel genetischer Risikofaktoren in der Pathogenese einer CP ^[134].

Die Gesamtheit dieser Risiko- und Umweltfaktoren können schließlich zu örtlich und zeitlich versetzten Parenchymuntergängen des Organs führen. Die entstandenen nekrotischen Gewebeareale werden im Prozess der Defektheilung durch kollagenreiches Gewebe ersetzt und

umgebaut. Das Abwechseln von autodigestiv induzierten Parenchymnekrosen im Pankreas und anschließender Vernarbung des Organs durch Wundheilungsprozesse lässt sich nach Klöppel *et al.* als „Nekrose-Fibrose-Sequenz“ bezeichnen. Sie geht mit einem fortschreitenden Untergang des exo- und endokrinen Pankreasgewebes einher und führt somit zum Funktionsverlust der Bauchspeicheldrüse bzw. zur Pankreasinsuffizienz. Im klinischen Verlauf sind daher Verdauungsstörungen (exokrin) und eine diabetogene Stoffwechsellaage (endokrin) obligat [68]. Unterhalten wird dieser Pathomechanismus durch eine Vielzahl humoraler und zellulärer Faktoren.

In der Bauchspeicheldrüse vorkommende, Vitamin-A speichernde pankreatische Sternzellen (PSZ) konnten auf zellulärer Ebene als Hauptverantwortliche der Bindegewebsproduktion ausgemacht werden. Sie befinden sich zusammen mit Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile), Monozyten und Makrophagen in einer für die CP charakteristischen fibrotischen Matrix [27]. Das dort vorherrschende Mikro-Milieu wird durch pro- und anti-inflammatorische Zytokine (Interleukin(IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IL-33, und Tumornekrosefaktor(TNF- α)) mitbestimmt. Es begünstigt ebenfalls durch die Induktion profibrotischer Prozesse in den Stromazellen die Pathogenese der CP. Die weitere Aktivierung der PSZ und die Aufrechterhaltung der EZM-Produktion werden wahrscheinlich durch die humoralen Faktoren des Mikromilieus mitbestimmt. Dies lässt die Vermutung zu, dass autokrine Regelmechanismen der PSZs existieren [58, 145].

Seit kurzem wird neben den erwähnten Mechanismen zur Entstehung einer CP auch eine chronische Inflammation des Organs mit einer autoimmunen Ätiologie in Betracht gezogen. Auf diese für die eigenen Arbeiten relevante Sonderform der CP geht der folgende Abschnitt näher ein.

1.1.3 Autoimmune Pankreatitis (AIP)

1.1.3.1 Eine eigene Entität, die es zu unterscheiden gilt

1961 erfolgte eine erste Beschreibung einer idiopathisch chronisch inflammatorischen Sklerosierung des Organs durch Sarles *et al.* Drei Jahrzehnte später wurde 1991 durch Kawaguchi *et al.* eine lymphoplasmatisch sklerosierende Pankreatitis beschrieben. Erst 1995 verwendeten Yoshida *et al.* in Japan den Terminus einer autoimmunen Pankreatitis (AIP) zur Beschreibung einer neu entdeckten Form der CP [67, 108, 144].

Die AIP stellt eine eigenständige Form chronischer Pankreatitiden dar. Das klinische Erscheinungsbild sowie die Auffälligkeiten in der Bildgebung ähneln jedoch oft denen von malignen pankreatischen Prozessen. Es bestehen Schwierigkeiten in der Abgrenzung und

Unterscheidung des Krankheitsbildes einer AIP von einer CP anderer Genese und vor allem von einem PC – wobei selbst eine präoperative Diagnose einer AIP eine Co-Existenz eines PC nicht ausschließen kann [75].

Unterschiede bestehen in der Wirksamkeit einer Pharmakotherapie. Die wirksame Therapieoption zur Behandlung einer AIP stellen Steroide dar. Diese sind bei anderen Formen chronischer Pankreatitiden nicht wirksam und können beim PC auf Grund ihrer immunmodulatorischen Wirkungen sogar zu einer Diagnoseverschleppung führen. Trotz der adäquaten konservativ medikamentös geführten Kortikosteroidtherapie und einigen Studien, herrscht bis dato kein wissenschaftlicher Konsens zur Therapiedauer und dem Langzeittherapieerfolg [43]. Es treten vereinzelt Rezidive auf und die Patienten haben darüber hinaus mit den bekannten Nebenwirkungen einer Glukokortikoid-Langzeittherapie zu kämpfen [83]. Die Erforschung der Erkrankung mit dem Ziel der Verbesserung diagnostischer Kriterien zur Sicherung einer AIP und dem Ausschluss eines Malignitätsverdachts ist angezeigt. Eine verbesserte Diagnostik ist auch aufgrund der therapeutischen Konsequenzen für den einzelnen individuellen Patienten erforderlich.

Es müssen am besten schon *a priori* vergleichbare, validierte und allgemein anwendbare Untersuchungskriterien geschaffen werden, die eine statistisch wahrscheinliche Diagnose und Abgrenzung der AIP ermöglichen. Ein Therapieversuch als Methode der Diagnosesicherung würde dann entbehrlich sein.

1.1.3.2 Pathologie und Subtypen

Zur genaueren Charakterisierung und Diagnose einer AIP wurden daher weltweit verschiedene *Scoring*-Systeme entwickelt und herangezogen. In den USA zum Beispiel definierten Chari *et al.* 2006 die HISORt-Kriterien, die eine Adaptation der bis dato existierenden Kriterien der "*Japanese Pancreas Society*" (PJS) darstellen [98]. Die HISORt-Kriterien beinhalten die umfangreiche Histologie (H), eine charakteristische Bildgebung (I), eine ausführliche IgG₄-Serologie (S), das Ausmaß der Beteiligung anderer Organe (O) sowie die für eine AIP typische Glukokortikoid-Therapieempfindlichkeit (Rt) zur Charakterisierung der Erkrankung [18, 62]. Die Histologie stellt dabei den diagnostischen "Goldstandard" der AIP dar.

In den letzten Jahren führte die zunehmende Erforschung der AIP zu einem näheren Verständnis dieser Erkrankung mit ihrer komplexen Pathogenese, den genetischen Prädispositionen sowie möglichen extrapankreatischen Manifestationen. Basierend auf neueren histologischen und pathogenetischen Untersuchungen wird die AIP in 2 Subtypen unterteilt. Dem tragen auch die 2010 von einer internationalen Expertengruppe formulierten "*international consensus diagnostic*

criteria" (ICDC) zur Diagnose der AIP Rechnung [60, 105, 112]. Die AIP vom Subtyp 1 tritt dabei zum einen als isoliertes Krankheitsgeschehen des Drüsenapparates auf, kann aber zum anderen auch assoziiert als Teil einer systemischen Erkrankung mit hohen Anteilen an IgG₄-produzierenden Plasmazellen imponieren. Nicht selten sind bei dieser zuletzt genannten Form auch andere Organsysteme wie das Speicheldrüsengewebe, mit Symptomen ähnlich eines Sjögren Syndroms, die Nieren oder auch die Gallenwege mit Strikturen der extra- und intrahepatischen Ausführungsgänge involviert [61, 102, 117].

Die AIP Typ 1 wird den *IgG₄-related disease* (IRDs) zugeordnet, die sich typischerweise in einer massiven periduktalen lymphoplasmazytären Infiltration mit einem hohen Anteil IgG₄-positiver Plasmazellen, einer starken storiformen Fibrose und obliterativen Phlebitiden manifestiert [117]. Das Krankheitsbild wurde deshalb auch als lymphoplasmazytäre sklerosierende Pankreatitis (LPSP) bezeichnet. Die IgG₄ produzierenden Plasmazellen sind auch hier wiederum in eine fibrotische Matrix eingebettet, die von aktivierten PSZ synthetisiert und unterhalten wird [27, 92]. Die zweite Form der AIP wird als idiopathische dukt-zentrische Pankreatitis (IDCP, AIP Typ 2) bezeichnet. Histologisch finden sich charakteristische duktale granulozytäre epitheliale Läsionen (GEL), die mit einer Destruktion des Gangsystems und gelegentlich auch mit Mikroabzessen einhergehen können. Die IDCP ist im Gegensatz zur LPSP durch eine neutrophile Infiltration des Epitheliums des *Ductus pancreaticus* charakterisiert, wobei das gleichzeitige Vorliegen von IgG₄-positiven Plasmazellinfiltrationen ungewöhnlich ist [44, 89].

1.1.3.3 Epidemiologie

Das noch relativ junge Konzept der Existenz einer AIP als eigene Entität spiegelt sich auch in der epidemiologischen Datenlage wider. Derzeit existieren weltweit nur wenige Studien zur genauen Prävalenz und Inzidenz dieser Erkrankung. Fest steht jedoch, dass die AIP ein seltenes Erkrankungsbild darstellt. Eine zunehmende Inzidenz scheint wahrscheinlich, wird jedoch durch den Anteil der nun steigenden Diagnosemöglichkeiten mitbeeinflusst.

Valide Daten liegen in erster Linie für Japan vor. In einer landesweit durch das "*Research Committee of Intractable Pancreatic Diseases*" (RCIPD) durchgeführten Studie wurde eine Prävalenz der AIP von 0,9/100.000 erhoben. Eine zweite, 2006 durchgeführte Studie erbrachte unter Anwendung der bereits erwähnten neuen Diagnosekriterien eine Prävalenz von 2,2/100.000. Das Erkrankungsalter der AIP-Patienten lag dabei statistisch gesehen in der siebten Dekade, wobei zugleich 95 % aller Patienten das 45. Lebensjahr überschritten hatten [63, 88].

Für Deutschland existieren aktuelle Daten zur Prävalenz und Inzidenz der Erkrankung lediglich für Einwohner im Südwesten der Republik. Die Gruppe um Schneider *et al.* beschrieb bei

Patienten mit einer nicht-alkoholbedingten Pankreatitis eine Prävalenz der AIP von ca. 9 %. Bei Patienten mit Alkohol-bedingten Pankreatitiden konnte eine AIP nicht beobachtet werden. Die Inzidenz der AIP wird anhand der Daten auf weniger als eine Neuerkrankung pro 100.000 Einwohner und Jahr geschätzt ^[110].

1.1.3.4 Pathophysiologie – Zusammenspiel zellulärer und humoraler Faktoren

Sowohl die Pathogenese als auch die Pathophysiologie der AIP wurden im Detail noch nicht vollständig verstanden. Als wahrscheinlich gelten die Beteiligung krankheitsspezifischer oder mit der AIP assoziierter Antigene sowie Fehlfunktionen des angeborenen oder erworbenen humoralen und zellulären Immunsystems ^[91, 94, 101].

Kawa *et al.* führten zuerst die Anfälligkeit japanischer Patienten, an einer AIP zu erkranken, auf die Expression von Klasse-II-Haupthistokompatibilitätskomplexen (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) zurück (speziell HLA(*Human Leukocyte Antigen*)-DRB1*0405 – DQB1*0401) ^[66]. Etwas später konnten Umemura *et al.* zeigen, dass die Serum-IgG₄-Konzentrationen japanischer Patienten mit einer AIP signifikant positiv mit der Anzahl auf B-Lymphozyten exprimierten *Fc-receptor like 3* (FCRL3) Molekülen korrelieren. FCRL3 wird auch in erhöhtem Maße auf B-Lymphozyten von Patienten mit anderen autoimmunen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA), autoimmunen Formen von Schilddrüsenerkrankungen und dem SLE nachgewiesen. Dieselbe Korrelation mit den Immunglobulin-Konzentrationen konnte auch für das auf CD(*cluster of differentiation*)4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten exprimierte *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) nachgewiesen werden ^[124, 125]. 2011 untersuchten Ota *et al.* die Assoziation der AIP mit *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) und traten den Beweis an, dass ein Polymorphismus im KCNA3 (*Potassium voltage-gated channel, member 3*)-Gen mit dieser Erkrankung vergesellschaftet ist ^[95]. Auch Gen-Varianten des CFTR, der schon in der Pathogenese anderer chronischer Pankreatitiden eine Rolle spielt, sollen mit der Entstehung der AIP assoziiert sein ^[17, 96].

1.1.3.4.1 Potenzielle humorale Faktoren

Von Seiten des humoralen Immunsystems trägt die Bildung von Autoantikörpern durch Plasmazellen zur Pathogenese bei. Als pathohistologisches Korrelat finden sich die bereits erwähnten zahlreichen Plasmazell-Infiltrate. AIP-assoziierte Autoantikörper sind unter anderem gegen Lactoferrin (LF), die Carboanhydrase (CA) II und IV, den *pancreatic secretory trypsin inhibitor* (PSTI) sowie gegen das Plasminogen-bindende Protein (PBP) gerichtet ^[3, 5, 87]. Im

Zusammenhang mit dem zuletzt genannten PBP konnten durch Frulloni *et al.* Homologien zwischen humanen und bakteriellen Proteinsequenzen aufgezeigt werden, die zu einer Autoimmunität via Antikörper gegen die bakterielle Form beitragen könnten. Die Gruppe detektierte beim Screening der Blutproben von AIP-Patienten unter anderem die Peptide AIP₁₋₇, die Homologien zum PBP von *Helicobacter pylori* aufwiesen. Des Weiteren sollen auch Sequenzhomologien mit der humanen E3 Ubiquitin-Protein Ligase (UBR2) bestehen, die vermehrt in den Azinuszellen exprimiert wird. Dies könnte wiederum die Azini als mögliche Targets der Autoimmunität identifizieren [30]. Hinzu kommt, dass die hohen Serum-Konzentrationen des IgG₄ die Beteiligung einer humoralen Immunantwort nahelegen, auch wenn dessen Rolle in der Pathogenese bei weitem noch nicht geklärt werden konnte und zurzeit kontrovers diskutiert wird. Zumindest ist eine Beteiligung bei anderen Autoimmunerkrankungen wie dem *Pemphigus foliaceus* und einigen Fällen membranöser Glomerulonephritiden beschrieben worden [9, 24, 128, 130].

1.1.3.4.2 Potenzielle zelluläre Faktoren – und die Rolle dendritischer Zellen (DCs) in der (Auto-)Immunität

Der Beitrag zellulärer Immunreaktionen zur Autoimmunität und Pathogenese der AIP wird hingegen besser verstanden. Das Vorhandensein von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten sowie die Expression von HLA-DR-Antigenen im Pankreasgewebe gelten als akzeptiert und stützen die These immunologischer zellulärer Mechanismen in der Entstehung und Unterhaltung einer AIP [94]. Die potenzielle Rolle und der Einfluss dendritischer Zellen (DCs) als essenzielle Mediatoren zwischen humoralen und zellulären Immunantworten blieben bis dato bei der Betrachtung der Entstehung einer AIP nahezu unbeachtet.

Seit ihrer ersten Beschreibung im Jahre 1973 durch den kanadischen Immunologen Ralph M. Steinman wird DCs eine wichtige Rolle in der Initiation, Adaptation und Regulation von Immunantworten zugeschrieben. Diese Relevanz spiegelt sich auch in der Vergabe des Nobelpreises 2011 für Physiologie oder Medizin an Steinman zur Entdeckung der DCs und ihrer Rolle in der adaptiven Immunität wider [115].

DCs fungieren als spezialisierte „Wächterzellen“ des angeborenen Immunsystems als Bindeglied zwischen dem adaptiven humoralen und zellulären Immunsystem. Sie schreiten dabei nicht aktiv in zellulär vermittelte Abwehrreaktionen ein. Vielmehr erkennen und binden sie als Antigen-präsentierende Zellen (APZs) potenzielle Pathogene mithilfe so genannter Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs), zu denen auch die *toll-like receptors* (TLRs) gezählt werden. Nach der Inkorporation (Phagozytose) eines gebundenen potenziellen Antigen/Antigen-Rezeptor-Komplexes, wird dieser innerhalb der Zelle neu prozessiert und in

Form von Fragmenten bzw. Antigenstrukturen via MHC-Komplexen auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Antigen-Prozessierung führt auch bei den DCs zu phänotypischen Veränderungen und einer Zellreifung. Ausgereifte DCs exprimieren eine Vielzahl von MHC- und kostimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86 ^[72]. Auch CD83 wird spezifisch von reifen DCs exprimiert und scheint für die Zellfunktion und Vermittlung immunologischer Abwehrreaktionen von Bedeutung zu sein. Eine Herabregulation dieses Oberflächenmarkers wird bei Infektionen mit dem Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) und dem Humanen Zytomegalie Virus (HCMV) beobachtet ^[47, 48].

Erst einmal aktiviert, beginnen reife DCs in T-Zell-reiche sekundär lymphatische Organe (vorrangig Lymphknoten) zu migrieren, um Antigen-spezifischen T-Zellen ihre prozessierten Antigen-Fragmente präsentieren zu können. DCs beginnen in diesem Aktivierungszustand auch pro-inflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel IL-12, zu sezernieren. Sie initiieren und bahnen damit die T-Zell-Differenzierung hin zu Effektorzellen (T_H1) und aktivieren darüber hinaus eine Reihe weiterer Typen immunologisch wirksamer Zellen ^[116]. Dafür sind auf molekularer Ebene zunächst 2 Hauptsignale nötig: Das erste Signal besteht in der DC-T-Zell-Interaktion via des T-Zell-Rezeptors (TCR) mit den MHC-Molekülen von DCs (CD8⁺ T-Zellen binden an MHC-I; CD4⁺ T-Zellen an MHC-II). Eine Bindung der kostimulatorischen Moleküle CD80/86 (B7-Komplex) auf den DCs mit dem T-Zell-seitigen CD28 stellt das zweite essenzielle Signal dar. Nur T-Zellen, die beide Signale und Interaktionen durchlaufen haben, reifen zu aktivierten Effektor-T-Zellen heran ^[55, 56].

Humane DCs gehen aus CD34⁺ Stammzellen (HSC bzw. HSZ) hervor und können in drei Subtypen unterteilt werden. Die einzelnen Subpopulationen entwickeln sich unter der strengen Kontrolle eines spezifischen Repertoires und Zusammenspiels von Transkriptionsfaktoren, die schlussendlich mit der Expression des *Interferon Regulatory Factor* (IRF) 4 und 8 korrelieren ^[41, 38, 46]. Dies führte unter anderem zur Einteilung der Zellen in pDCs und zweier Typen konventioneller/myeloider DCs – cDC1 und cDC2. Hierbei definieren sich die humanen cDCs vor allem durch die Expression von CD141 (Thrombomodulin) und CD1c ^[148]. Die DC-Subtypen werden weiterhin strikt von DCs monozytärer Vorläuferzellen (Mo-DC) und Makrophagen-Populationen (Mo-Mac) von primitiven myeloiden Progenitorzellen (CMP bzw. MPZ) unterschieden. Die folgende Abbildung 1 gibt einen Überblick bzgl. der Differenzierung und Ontologie humaner DCs und sollen dazu beitragen, die in dieser Arbeit untersuchten Zellen weitestgehend einzuordnen.

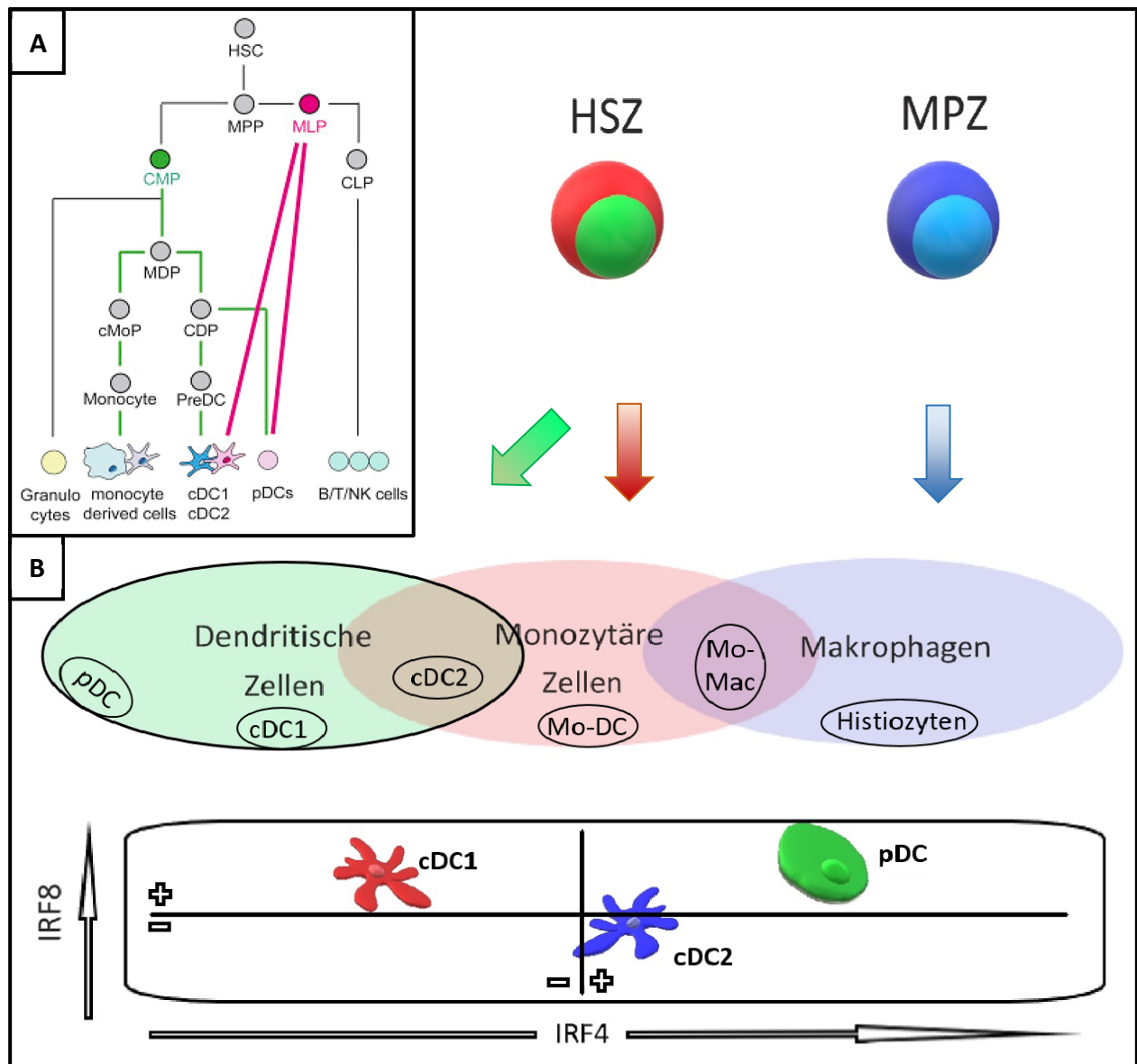


Abbildung 1. A: Ontologie humaner DCs. Aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSZs/HSCs) hervorgegangene myeloide (CMPs/MPZs) sowie multipotente lymphoide (MLPs) Progenitorzellen besitzen das Potenzial DCs zu generieren. CMPs rufen Makrophagen- und DC-Progenitorzellen (MDPs) hervor, die weiter hin zu gemeinsamen DC-Vorläuferzellen (CDP) differenzieren. CDPs wiederum rufen pDCs und zirkulierende prä-DCs hervor, die aus dem Knochenmark in die Blutbahn entlassen werden und in der Peripherie hin zu cDC1s und cDC2s differenzieren. (Mit freundlicher zur Verfügungstellung des Elsevier Verlags mit der Creative Commons Attribution License (CC BY) aus *Cell Reports*, Juli 2017)

B: Klassifikation humaner DCs anhand ihrer relativen IRF4- und IRF8-Expression. Die Abbildung zeigt den Ursprung der DC-, Monozyten- und Makrophagen-Klassifikation. Die unterschiedliche Zelldifferenzierung kann durch die relative Expression von *Interferon Regulatory Factor* (IRF) 4 und 8 erklärt werden. Monozyten exprimieren selbst nur wenig bis gar kein IRF4 oder IRF8, können jedoch induziert hin zu Mo-DCs differenzieren. Aus Monozyten hervorgegangene Makrophagen (Mo-Mac) unterscheiden sich ebenfalls in ihrer Ontologie von langlebigen gewebeständigen Makrophagen (Histiozyten), die wiederum aus frühen myeloiden Progenitorzellen (CMP/MPZ) hervorgegangen sind. cDC1s sind stark positiv für IRF8 (+) und negativ für IRF4 (-). cDC2s exprimieren lediglich nur wenig IRF4 (+). pDCs hingegen exprimieren beide der Transkriptionsfaktoren in hohem Maß (++).

DCs spielen eine essenzielle Rolle im immunologischen Gleichgewicht und bei der Ausübung immunologischer Toleranz gegenüber Organismus-eigenen Antigenstrukturen. Sie können via TGF- β und Retinoinsäurederivate T-regulatorische Zellen (Tregs) induzieren sowie deren Proliferation und Überleben durch die Expression und Interaktion kostimulatorischer Moleküle (CD80/86) begünstigen ^[119, 142]. Es ist verständlich, dass Fehlentwicklungen und Fehlfunktionen in der Zellphysiologie der DCs Auswirkungen auf die Immunantworten und die immunologische Toleranz besitzen. Autoimmunität kann demnach eng mit den Dendriten-Funktionen vergesellschaftet sein. So ist auch bei der Pathogenese der AIP, dem Sjögren-Syndrom und weiterer Autoimmunerkrankungen eine Beteiligung von dysfunktionalen Dendriten denkbar ^[35]. 2011 identifizierten Asghari *et al.* bei der Untersuchung untereinander gekreuzter Mausarten mehrere *quantitative trait loci* (QTLs) der AIP, also Abschnitte von Chromosomen, die einen Einfluss auf die Ausprägung dieser Erkrankung haben. Die Forscher fanden dabei potenzielle Risikogene der AIP, darunter auch solche mit Funktionen in den DCs ^[6]. Zwei dieser QTLs waren von großem Interesse für diese Arbeit, da sie eng im Zusammenhang mit der Zellphysiologie und den Zellfunktionen von DCs stehen. Dies waren zum einen der *C-type lectin domain family 4 member a2* (*Clec4a2*) und zum anderen der *triggering receptor expressed on myeloid cells* (*TREM2*). *Clec4a2* wird unter anderem auch als *dendritic cell immunoreceptor* (DCIR) bezeichnet, und gehört zur Familie der Kohlenhydrat-bindenden Lektine. Sie sind im weiteren Sinne PPRs und damit immunologisch wichtige Proteinstrukturen, die ihrer Aufgabe als Zuckersequenz-bindende Antigen-Rezeptoren nachkommen und die Aktivierung immunkompetenter Zellen unterstützen. *Clec4a2* wird hauptsächlich auf DCs exprimiert ^[121]. In Analogie dazu kann Studien zufolge bei DCIR-defizienten Mäusen eine Inhibierung der DC-Expansion und DC-Aktivierung beobachtet werden ^[31, 121]. *TREM2* wird auf myeloiden Zellen und damit auch auf mDCs exprimiert. Es ist ein immunmodulierender Rezeptor mit einer zentralen Rolle für die Aktivierung und das Überleben myeloider Zellen ^[69]. Die Meinungen über die Rolle von *TREM2* bezüglich eines Inflammationsgeschehens gehen zurzeit noch weit auseinander ^[29]. In experimentellen Versuchen zur Darmwandschädigung infiltrierten *TREM2*-exprimierende Makrophagen verstärkt die Wundareale, inhibierten die Expression pro-inflammatorischer Zytokine und unterstützten zugleich die Expression der T_H2 -Zytokine IL-4 und -13. Andererseits konnte in Studien zur chemischen Schädigung bei entzündlichen abdominalen Erkrankungen ein durch *TREM2* vermittelter pro-inflammatorischer Phänotyp der APZs ausgemacht werden, der im Endeffekt den Wundheilungsprozess sogar behinderte ^[21].

Als weitere mögliche Risikogene der AIP wurden in dieser Arbeit zusätzlich *cytohesin 1 interacting protein* (*Cytip*) sowie der *UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5* (*Galnt5*) untersucht. *Cytip* wird schwach auf NK-Zellen exprimiert und spielt eine Rolle bei der Zelladhäsion und Interaktion von DCs und T-Zellen. Es ist ein Guanin Nukleotid-Austausch Protein und moduliert die Aktivierung von Adenosyl-Ribosylierungs-Faktoren (ARFs) [45]. *Galnt5* wird hingegen mit der Progression maligner Tumore in Verbindung gebracht und zumindest bei einigen Tumorentitäten als prognostisch relevanter Verlaufsmarker angesehen [10].

2015 konnten Arai *et al.* im Mausmodell eine Beteiligung von plasmazytoiden DCs (pDCs) bei der Entstehung und Unterhaltung einer IgG₄ vergesellschafteten AIP herausarbeiten. Bei ihren Untersuchungen konnten sie beobachten, dass die Aktivierung und Kumulation von pDCs sowie das von ihnen sezernierte IFN- α eine maßgebliche Rolle bei der Entstehung der murinen AIP spielen. Sie nahmen weiter an, dass diese molekularen Mechanismen in Relation zur IgG₄-Produktion ebenfalls mitursächlich für eine Entstehung der Erkrankung beim Menschen sind. Die gleiche Gruppe untersuchte in einer weiteren Studie die Beteiligung von pDCs bei dem chronischen fibro-inflammatorischen Umbau des Pankreasgewebes im Rahmen einer AIP. Die Forscher beobachteten, dass die Gewebereaktion von der Anwesenheit des IFN- α und des IL-33 abhängig ist, welche wiederum von pDCs produziert werden [4, 132].

1.1.3.4.3 Der MRL/MpJ-Mausstamm als geeignetes Mausmodell

Asghari *et al.*, Arai *et al.* sowie Watanabe *et al.* nutzten bei ihren Untersuchungen zur AIP den MRL/MpJ-Mausstamm. Diese Mäuse bilden spontan – obwohl sie als Kontrollstamm des *Fas*-mutierten Stammes MRL/MpJ-*Fas*^{lpr} über das normale *Fas*-Gen verfügen – im Laufe ihres Lebens autoimmune Erkrankungen aus [97]. Die Symptome dieser Autoimmunkrankheiten manifestieren sich vor allem im höheren Lebensalter der Mäuse. Neben Erkrankungen wie dem Systemischen Lupus Erythematosus (SLE) und dem Sjögren Syndrom, entwickeln Mäuse dieses Stammes auch eine mit diesen Erkrankungen vergesellschaftete AIP [102]. Auffallend sind dabei alters- und geschlechtsspezifische Eigenarten, da sich die Erkrankung tendenziell bei weiblichen Tieren fortgeschrittenen Alters (etwa zwischen der 34. und 38. Lebenswoche) mit einer Inzidenz von 74 % manifestiert [64]. Das Auftreten muriner AIPs ist hierbei maßgeblich durch das Ausmaß fehlerhafter Immunantworten sowie mikrozirkulatorischen Störungen determiniert [114].

Experimentell lässt sich eine AIP in MRL/MpJ-Mäusen durch die Applikation von *Polyinosin:Polycytidyl-Säure* (Poly I:C) und Interferon-gamma (IFN γ) induzieren bzw. verstärken [28, 104]. Poly I:C ist ein synthetisch generiertes doppelsträngiges Ribonukleotid-Analogon, welches

die Struktur viraler RNA nachahmt. Es nimmt unter anderem die Rolle als Ligand für den *toll-like-receptor-3* (TLR3) ein, aktiviert in diesem Zusammenhang APZs und kann darüber hinaus immunmodulierend in Richtung einer T_H2 -Zell Antwort wirksam sein ^[1]. Fest steht, dass MRL/MpJ Mäuse mit einer Poly I:C induzierten autoimmunen Pankreatitis früher und schwerer erkranken als Tiere des gleichen Stammes mit einer spontan einsetzenden Erkrankung ^[111, 104].

Als genetischer Defekt fällt bei diesen Mäusen eine spontane Mutation im *IL2^{ml}*-Allel auf, welches für die Ausprägung eines Teils der Bindungsseite des Interleukin-2-Rezeptors verantwortlich ist. Die resultierende hypoaktive Variante des IL2-Rezeptors und die assoziierte Abnahme der T-Zell-Aktivierung tragen maßgeblich zu der Minderung der Apoptose von Immunzellen in autoimmun anfälligen MRL/MpJ-Mäusen bei ^[19].

Die MRL/MpJ-Mäuse bildeten auch in dieser Arbeit den AIP-suszeptiblen Stamm und wurden zur Untersuchung grundlegender Prozesse dieser Erkrankung verwendet.

1.1.3.5 Aktuelles Konzept der Erkrankung – DCs und Tregs

Auch das aktuelle Konzept der AIP berücksichtigt die Dendritenfunktionen und die Rolle dieser Zellen in der Pathogenese und Unterhaltung der Erkrankung und fügt diese in einen größeren Kontext ein. Wichtig ist hierbei unter anderem die Interaktion der DCs mit T-regulatorischen Zellen (Tregs), welche einen großen Einfluss auf die (Auto-)Immunität besitzt ^[103, 123].

Tregs ($CD4^+CD25^+$) besitzen vorwiegend inhibitorische Wirkungen auf die T-Zell-vermittelten Immunantworten. Diese Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor *forkhead box P3* (FOXP3), der eine Schlüsselrolle im Immunsystem spielt und unverzichtbar für die Aufrechterhaltung der immunologischen Selbsttoleranz und Homöostase ist ^[51]. Eine Dysfunktion von FOXP3 wird bei einer Vielzahl autoimmuner Erkrankungen, Immunopathologien und Allergien beobachtet und steht mit diesen im direkten kausalen Zusammenhang ^[34]. FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ Tregs können die Aktivierung und Proliferation von Effektor-Immunzellen wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK), B-Zellen und APZs *in vitro* und *in vivo* supprimieren ^[107]. Diese einzigartige Fähigkeit lässt FOXP3⁺ Tregs komplexe Immunantworten und damit die Entstehung autoimmuner Erkrankungen, Immunopathologien und Allergien kontrollieren.

Die Entwicklung und Differenzierung von Tregs erfolgt ausgehend von in der Peripherie aktivierten CD45RA⁺ naiven T-Zellen hin zu konventionellen und regulatorischen Unterformen. Konventionelle Tregs differenzieren sich weiter zu *memory*-Tregs, die erneut reaktiviert werden können. Sie triggern die Organfibrose und sind in der Lage, B-Lymphozyten durch die Sekretion von IL-10 zu aktivieren. Die B-Zellantworten und die hohen IgG₄-Konzentrationen werden bei Patienten mit einer IgG₄-bedingten AIP zudem durch die Aktivierung von *Nucleotide-binding*

oligomerization domain-containing protein(NOD)-2 und TLR auf Monozyten und basophilen Granulozyten gefördert. Die Signalwege münden in einer Hochregulation von *B-cell activating factor* (BAFF) und IL-13 [131]. Das Resultat ist eine massive Steigerung der IgG₄-Produktion.

CD45RA⁺ naive T-Zellen differenzieren auch in CD45RA⁺ Effektor-Tregs. Diese Zelluntergruppe ist sehr heterogen, was die Expression des *inducible T-cell costimulatory molecule* (ICOS) anbelangt. Dieses gehört zur CD28- und CTLA-4-Rezeptor-Familie und spielt eine entscheidende Rolle im T-Zell-*signaling*, bei Immunantworten und der Zellproliferation. Im peripheren Blut konnten zwei funktionell unterschiedliche ICOS⁺ und ICOS⁻-Unterarten der Effektor-Tregs ausgemacht werden. ICOS⁺ wie auch ICOS⁻ Effektor-Tregs produzieren dabei immunsuppressive Zytokine wie IL-10 bzw. TGF- β [57]. Entscheidend ist, dass das Wachstum IL-10-produzierender Tregs maßgeblich von der Expression eines Liganden für ICOS durch DCs abhängt. Eine Blockade des ICOS/ICOS-Ligand-*signalings* verhindert entsprechend das Wachstum dieser Zellen [2]. DCs besitzen damit einen hohen Stellenwert in der Proliferation ICOS⁺ und ICOS⁻ Effektor-Tregs und stellen ein essenzielles Bindeglied in der Modulation von (Auto-)Immunantworten dar. Während aktivierte pDCs vornehmlich die Proliferation ICOS⁺ Tregs durch den ICOS-Ligand unterstützen, fördern aus monozytären Vorstufen differenzierte mDCs eher die Proliferation von autologen ICOS⁻ Tregs durch den B7-Signalweg [57].

Im Falle einer AIP ist die Anzahl zirkulierender CD45RA⁺ Tregs in Analogie zu einer erhöhten CTLA-4-Konzentration signifikant erniedrigt [84]. Weitere flusszytometrische Untersuchungen belegen eine signifikant erhöhte Anzahl ICOS⁺IL-10⁺ Tregs im peripheren Blut von AIP-Patienten [70]. Die Untersuchungen konnten auch ein Repertoire aus drei verschiedenen DC-Typen nachweisen. Es handelt sich um HLA-DR⁺CD11c⁺ mDCs, HLA-DR⁺CD11c⁻ pDCs und HLA-DR⁺CD11c⁻CD123⁺ pDCs. Die Wechselwirkungen unter Tregs und DCs bei einer AIP sind dabei noch nicht völlig verstanden worden und bedürfen weiterer intensiver molekularer Beforschung. Aus dieser Fülle an Erkenntnissen entwickelten Okazaki *et al.* ein hypothetisches Konzept zur Pathogenese der AIP, welches die Beteiligung und die Wechselwirkungen des angeborenen und erworbenen humoralen und zellulären Immunsystems mit einbezieht [92, 93]. Die Abbildung illustriert die inhaltlichen zwei Hauptpfeiler „Induktion“ und „Progression“ der Überlegungen zur Entstehung einer AIP. Die Basis des Konzepts bilden vor allem die Fehlfunktionen des zellulären Immunsystems mit einer erniedrigten Aktivität und Anzahl von Tregs dar (s. f. S. Abb. 2).

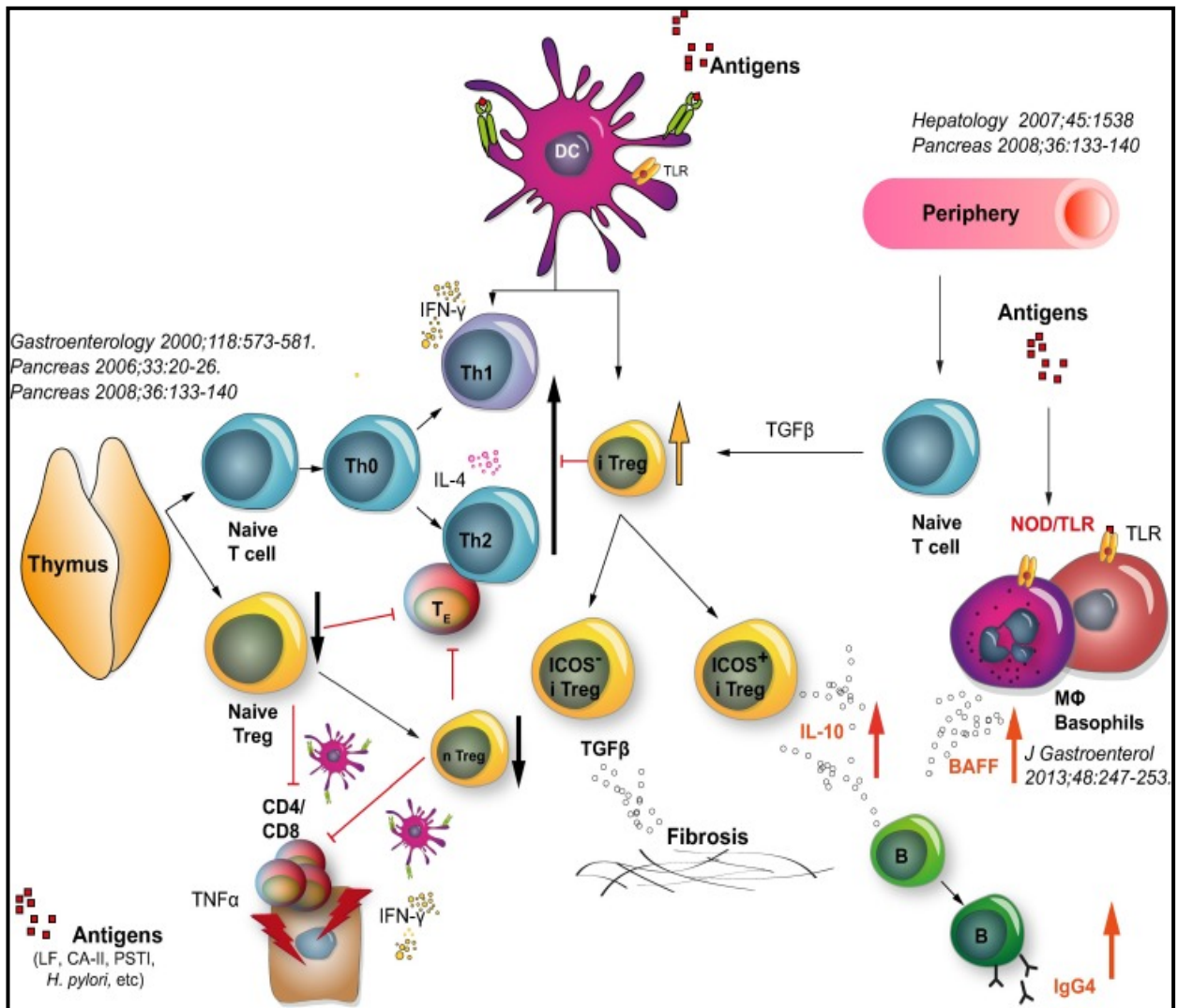


Abbildung 2: Hypothetische Pathogenese der autoimmunen Pankreatitis (AIP) und IgG4-bedingter Erkrankungen. Hinsichtlich der zentralen immunologischen Toleranz supprimieren naive und natürliche Tregs normalerweise Thymus-eigene autoreaktive CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Im Falle von IgG4-vergesellschafteten Erkrankungen – zu denen auch die AIP zählt – treten biphasische Mechanismen von „Induktion“ und „Progression“ in Kraft. Die initiale Immunantwort gegenüber Selbst-Antigenen (wie bereits erwähnt LF, CA-II und –IV, PSTI, Amylase-α, und PBP) könnte durch eine verminderte Anzahl naiver Tregs bedingt sein („Induktion“). Eine verstärkte Th2-Immunantwort, im Anschluss an eine zunächst Th1-Zell-vermittelte Immunantwort mit der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (IFN-γ, IL-1β, IL-2 und TNF-α), wäre die Folge. Diese Th2-Zell-typische Immunantwort könnte mit der Unterstützung der B-Zell-Funktionen und der Produktion von Immunglobulinen (IgG4) und Autoantikörpern in die Pathogenese und Pathophysiologie der AIP involviert sein und diese unterhalten („Progression“). Die IgG4-Konzentrationen und die Organfibrose können durch erhöhte IL-10- und TGF-β-Konzentrationen beeinflusst sein, die entsprechend von induzierbaren *memory*-Tregs sezerniert werden. Andererseits erhöht aber auch die Aktivierung von NOD-oder *toll-like*-Rezeptoren auf Monozyten und Basophilen die IgG4-Konzentration via einer Expressionssteigerung von BAFF und IL-13. Der Einfluss und die Beteiligung von Antigen-präsentierenden DCs auf die beschriebenen Mechanismen der „Induktion“ und „Progression“ gelten als wahrscheinlich.

(Mit freundlicher zur Verfügungstellung des Elsevier Verlags mit der Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivates License (CC BY NC ND) aus dem *Journal of Hepatology*, September 2015)

1.2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Verständnis der Pathogenese einer AIP weiter zu vertiefen. Speziell sollte dabei durch *in vitro* Studien ein möglicher Beitrag dendritischer Zellen zu dieser Erkrankung genauer herausgearbeitet werden, da aus solchen Studien langfristig neue Therapieansätze und diagnostische Verfahren erwachsen können.

Dafür wurden, basierend auf den Vorarbeiten von Lutz *et al.*, DCs aus den Knochenmarkszellen von MRL/MpJ-Mäusen generiert ^[74]. Es folgten anschließende *in vitro* Untersuchungen an den DCs, um mögliche krankheitsspezifische funktionale Charakteristika genauer herauszuarbeiten und einen besseren Überblick der DC-Funktionen im Kontext einer AIP zu schaffen. Konkret wurden Versuchsvorhaben zum Proliferationsverhalten, zur Rezeptor-Expression und Expression humoraler Faktoren durch flusszytometrische Analysen, Proliferationsassays (BrdU), *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISAs) sowie Echtzeit-PCR-Analysen realisiert. Auf Grundlage der Hypothese, dass DCs im Rahmen einer AIP eine fehlregulierte, pro-inflammatorische Immunantwort unterhalten und begünstigen, wurden die folgenden in dieser Arbeit beschriebenen Experimente durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Mausstämme/ Mausmodelle der autoimmunen Pankreatitis

Für die detaillierte Untersuchung der Rolle der DCs in der Pathogenese der AIP wurde sich in dieser Arbeit der MRL/MpJ- und CAST/EiJ-Mausmodelle bedient.

Die bereits in der Einleitung beschriebenen MRL/MpJ-Mäuse bildeten in dieser Studie den AIP-suszeptiblen Stamm und wurden zur Untersuchung grundlegender Prozesse dieser Erkrankung verwendet.

Dagegen wurde als Kontrolle ein AIP-resistenter Mausstamm – CAST/EiJ – genutzt. Diese Mäuse leiten sich wie ihre Artverwandten des CASA/RkJ-Mausstammes von thailändischen Wildmäusen ab. Sie werden häufig für genetische Forschungszwecke mit gängigen Labor-relevanten Mausstämmen verpaart, um F1-Hybride mit einem hohen Maß an Heterozygotie zu generieren. Als genetische Besonderheiten fallen bei diesen Mäusen Mutationen in Genen auf, die für den *aryl-hydrocarbon receptor* (*Ahr*^d) und die *2'-5' oligoadenylate synthetase 1B* (*Oas1b*^{Flv-r}) kodieren [54, 99]. Dies spiegelt sich, in Anbetracht einer veränderten Mastzell-Homöostase sowie einer generalisierten geringeren Infektanfälligkeit, in einer modifizierten Immunsystemleistung wider [113, 126, 147].

CAST/EiJ-Mäuse bilden somit einen von vielen anderen Labormäusen genetisch stark differierenden Stamm, der durch seine komplexen phenotypischen Charakteristika als wertvolles Werkzeug systematischer Untersuchungen dienen kann.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Tiere stammen ursprünglich von den *Jackson Laboratories* aus den USA und wurden weiterführend in der im Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie (IEC) ansässigen Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock weitergezüchtet. Die Mäuse wurden unter spezifischen Pathogen-freien (SPF-) Bedingungen in einem zwölfstündlich wechselnden hell/dunkel Rhythmus gehalten und mit unbegrenzt zur Verfügung stehender Nahrung und Wasser versorgt.

2.2 Präparation, Isolierung und Kultivierung dendritischer Zellen (DCs) aus dem Knochenmark

Weibliche sowie männliche MRL/MpJ- und CAST/EiJ-Mäuse dienten der Gewinnung von DCs aus dem Knochenmark. Die Vorgehensweise für die Generierung von DCs aus Knochenmarkszellen basierte dabei maßgeblich auf den etablierten *in vitro* Kultivierungsmethoden aus den Vorarbeiten von Manfred B. Lutz *et al.* ^[74]. Nur so war es möglich, eine genügend große Ausbeute dieser Zellen für die Studien zu erzielen.

2.2.1 Präparation der Mäuse

Die Tiere wurden zunächst durch die intraperitoneale Applikation eines überdosierten Ketamin/Xylazin-Stoffgemisches (Stammlösung: 0,2 ml Xylazin 2% + 0,6 ml Ketamin 10% = 4 mg Xylazin sowie 60 mg Ketamin in 0,8 ml) in tiefe Narkose versetzt. Anschließend erfolgte das Ausbluten der Tiere über den retrobulbären Venenplexus. Durch das Einstechen einer Kapillare wurde dabei das gewonnene Blut in koagulationsinduzierende Serum-Röhrchen überführt. Zur Sicherstellung des definitiven Todes diente die zervikale Dislokation durch Druck mit einer Pinzette am Nacken unter gleichzeitigem Zug am Schwanz des Tieres. Anschließend wurde das Abdomen durch einen Medianschnitt zur Organentnahme eröffnet. Das Pankreas, die Leber und die Milz wurden entnommen. Jeweils ein Teil der Organe wurde in *Tissue-Tek*® eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingelagert. Der andere Teil der Gewebe wurde bei 4 °C in mit Formalin 4 % befüllten Röhrchen aufbewahrt und anschließend für eine längerfristige Lagerung in Paraffin eingebettet. Im Anschluss wurden die unteren Extremitäten vom Fell befreit, um diese inkl. des Femurkopfes (für eine möglichst hohe Ausbeute an KM-Zellen) frei zu präparieren und durch einen Schnitt vom knöchernen Becken zu trennen. Die Achillessehnen wurden durchtrennt und die Füße vorsichtig abgeschnitten. Nach dem Durchschneiden des *Lig. patellae* wurden Ober- und Unterschenkel voneinander gelöst und anschließend Tibia und Femur unter Verwendung von *Kimwipe*-Tüchern von Muskel- und Bindegewebe befreit. Während der gesamten Präparation wurden die Knochen in einer Petrischale mit PBS auf Eis gelagert, um eine Dehydration des Materials zu vermeiden.

Nun wurde begonnen, die Knochen durch einen Schnitt kondylenseitig zu eröffnen und dabei so wenig wie möglich von den Kondylen abzuschneiden, da hier in Epiphysennähe eine hohe Zelldichte vorherrscht. Die diaphysären Markhöhlen wurden durch eine mit 5 ml eiskaltem PBS befüllte Spritze und mit verschiedenen Kanülen gespült und so die PBS/Zell-Suspension in

ebenfalls auf Eis lagernde 50 ml Tubes überführt. Die weitere Aufarbeitung der Knochenmarkszellen wurde im Labor fortgeführt.

2.2.2 Kultivierung dendritischer Zellen (DCs) – Tag 0

Die so gewonnene Zellsuspension (ZS) wurde steril unter laminarem *air flow* Bedingungen unter einer *flow bench* nach einigem Auf- und Abpipettieren durch ein 150 µm-Sieb filtriert und anschließend in ein frisches 50 ml Tube überführt.

Der bei der anschließenden Zentrifugation (300 x g, 4 °C, 10 min) entstandene Überstand (ÜS) wurde verworfen und das verbliebene Zellpellet in 5 ml DC-Medium resuspendiert. Das Medium basierte auf RPMI-1640 (Biochrom) Zellkultur-Medium mit zusätzlichen 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 1 % Penicillin/Streptomycin, β-Mercaptoethanol (β-ME, [50 µl/500 ml RPMI]) und für den jeweiligen aktuellen Volumenverbrauch frisch zugeführtem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF, [100 µg/ml → 1:5000]).

Zur anschließenden Zellzählung wurden 100 µl der ZS abgenommen und mit 100 µl Erythrozytenlyse-Puffer für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Der Lyse-Puffer beinhaltete dabei die Salze NaHCO₃ (0,839 g), NH₄Cl (8,290 g) und Na₂EDTA (0,037 g), welche durch Zugabe von 1000 ml zweifach destilliertem Wasser in Lösung gebracht und auf einen pH von 7,3 eingestellt wurden.

Schließlich stoppte die Zugabe von 800 µl PBS die Lyse ab und jeweils 20 µl der ZS konnten nach Vermischung mit 20 µl Trypanblau zur Zählung in einer „Neubauer improved“-Zählkammer aufgetragen werden. Durch die zweimaligen 1:2 Verdünnungen ergab sich folgende Gleichung zur Zellzahlbestimmung:

$$\text{Zellzahl pro ml (insges.meist ca. } 60 \times 10^6 \text{ Zellen)} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen} \times 20 \times 10000}{4}$$

So konnten die entsprechenden Volumina berechnet und die Zellen in einer Konzentration von 3×10^5 / ml und 3 ml pro *well* auf 6 *well*-Platten eingesät werden. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre im wasserdampfgesättigten Brutschrank.

2.2.2.1 Tag 3

Nach der Kultivierung der Knochenmarkszellen erfolgten die Zugabe von frischem DC-Medium und die Erhöhung des Gesamtvolumens pro *well* auf 4 ml. Ohne Schwenken oder Schütteln der Platte wurde je 1 ml Medium verworfen, um dann erneut 2 ml frisches DC-Medium zuzuführen.

Bei der Zugabe konnten die Zellen nun durchgespült und aufgewirbelt werden, damit 20 µl für die anschließende Zellzählung zur Verfügung standen. Analog der vorherigen Zellzählung erfolgte dies mit Hilfe der bereits geschilderten Gleichung.

2.2.2.2 Tag 6 und 8

An den Tagen 6 und 8 nach der Knochenmarksisolation folgten weitere Mediumwechsel durch Spülen der *wells*. Hierfür wurden je *well* 2 ml der erzeugten ZS verwendet, wobei 20 µl als Aliquot für die sich erneut anschließende Zellzählung dienten. Nach der Zentrifugation mit 300 x g bei 4 °C für 10 min wurde das entstandene Zellpellet im Nachhinein in derselben Menge frischem DC-Medium resuspendiert und die ZS schlussendlich wieder den *wells* zugeführt.

2.2.2.3 Tag 9

Die Suspensionszellen wurden geerntet (*wells* mit ZS gründlich gespült und ÜS komplett entfernt) und 20 µl der ZS zur Zellzählung genutzt. Der Rest wurde mit 300 x g bei 4 °C 10 min abzentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und das Pellet in so viel frischem DC-Medium aufgenommen, wie *wells* abgeerntet wurden (1 *well* \approx 1 ml). Zur Einsaat von wiederum 3×10^5 Zellen/ml auf 6-*well*-Platten erfolgte eine weitere Zellzählung. Es schloss sich die Stimulation eines Teils der Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS, 1 µg/ml) im Rahmen der jeweiligen Versuchsanforderungen an. Die nicht stimulierten Zellen dienten dabei als Kontrollen. Angestrebt war, je eine 6-*well*-Platte \pm LPS pro Tier einzusäen.

Des Weiteren wurde ein Teil der Zellen für den folgenden 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU)-Proliferationsassay reserviert und das restliche Zellvolumen nach erneuter Zentrifugation in 500 µl FKS resuspendiert, um anschließend in ebenfalls 500 µl Einfriermedium (FKS + 20 % DMSO) bei zunächst -80 °C weggefroren und später dauerhaft bei -150 °C gelagert zu werden.

2.2.2.4 Tag 10

Die Suspensionszellen wurden wie am Vortag erneut geerntet und mit 300 x g bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Hierbei wurden dieses Mal die Medium-Überstände (je 5 mal 1 ml) in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für anschließende Untersuchungen bei -20 °C weggefroren. Die verbliebenen Zellpellets wurden in PBS aufgenommen, sodass etwa 5×10^5 – 1×10^6 Zellen pro Ansatz in 45 µl Gesamtvolumen für die anstehenden Antikörperfärbungen und durchflusszytometrischen Untersuchungen eingesetzt werden konnten.

2.3 BrdU-Assay

Zur Untersuchung des Zellwachstums und damit auch der Proliferationsleistung der Zellen wurden die DCs einem 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU)-Assay unterzogen. Das Prinzip des Assays sieht den Einbau des BrdU in die zelluläre DNA vor. Bei dem BrdU handelt es sich um ein Thymidin-Analogon, welches in der S-Phase des Zellzyklus als Falschbase in die DNA der Zellen eingebaut wird und durch eine anschließende Antikörper-gestützte photometrische Detektion eine quantitative Aussage über die Zellteilung ermöglicht.

Dazu wurden die Zellen am Tag 9 nach der Knochenmarksisolation (jeweils $1,5 \times 10^4$ pro *well*) in 96-well-half-area-Platten kultiviert und mit LPS sowie GM-CSF – die spezifischen Konzentrationen und Kombinationen der Wachstumsfaktoren in den jeweiligen *wells* sind dabei im Ergebnisteil beschrieben – für 24 h inkubiert. Nach weiteren 24 h erfolgte die Zugabe von 5 μ l BrdU (10 μ M), an die sich eine weitere 24-stündige Inkubation anschloss.

Danach wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers weiter aufgearbeitet: Kurz gefasst, folgten das Abpipettieren des Mediums und die anschließende Fixierung der Zellen mit einer Fixierlösung. Daraufhin wurde ein Antikörper gegen BrdU hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 90 min wurden die Zellen dreimal mit einem Waschpuffer gewaschen und auf einem Tuch abgeklopft, um Pufferreste zu beseitigen. Das anschließend zugegebene Substratreagenz (50 μ l) wurde von dem an dem BrdU-Antikörper gekoppelten Enzym in einer chemischen Reaktion umgesetzt. Diese Reaktion bedingte eine optische Blaufärbung der in den *wells* befindlichen Lösungen. Die Stärke der Färbung korrelierte mit der Menge an BrdU, welches zuvor in die zelluläre DNA eingebaut wurde. Gestoppt wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 25 μ l 1 M H_2SO_4 pro *well*, was einen Farbumschlag nach Gelb mit sich trug. Die Extinktion wurde dann mithilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

2.4 Durchflusszytometrie - Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Die Durchflusszytometrie erlaubt die morphologische und strukturelle Vermessung von Zellen, die einzeln in einem hohen Tempo an einer elektrischen Spannung oder einem Laserstrahl vorbeifließen ^[32]. Bei einer Form der Zytometrie werden die Zellen mit einem *flow sorter* in unterschiedliche Reagenzgefäße sortiert. Entsprechende Geräte nutzen zur Sortierung die verschiedenen Färbungen der zuvor Fluoreszenz-markierten Zellen aus und beschreiben das Verfahren der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS).

Das Prinzip dieser Zellsortierung beruht auf der Emission von optischen Signalen vonseiten der Zellen, wenn diese einen Laserstrahl passieren. Die Zellen werden für die gezielte Passage des

Messbereiches des Lasers durch einen Hüllstrom fokussiert und in einem Mikrokanal einer hochpräzisen Küvette einzeln nacheinander am Laserstrahl vorbeigeführt ^[127]. Die dabei entstehenden Fluoreszenzsignale werden von einem Detektor ausgewertet. Das detektierte Vorwärtstreulicht (FCS = *Forward Scatter*) ist dabei ein Maß für die Beugung des Lichts und korreliert mit dem Volumen der Zelle ^[32, 127]. Das Seitwärtstreulicht (SSC = *Side Scatter*) beschreibt das Ausmaß der Brechung des Lichts im rechten Winkel und gibt Aufschluss über die Granularität, die Größe, die nukleäre Struktur und Menge der Vesikel einer Zelle ^[127]. Somit können innerhalb eines kurzen Zeitintervalls (>1000 Zellen/s) repräsentative Aussagen über die verschiedenen Zell-Populationen getroffen werden ^[15, 32].

In dieser Studie wurden die DCs am FACSCalibur™ des Herstellers *BD Biosciences* vermessen. Hierfür wurden unbehandelte sowie eintägig mit LPS vorbehandelte Zellen am Tag 10 nach der Knochenmarksisolierung in 45 µl PBS aufgenommen. Die ca. 5×10^5 – 1×10^6 Zellen pro Ansatz wurden auf Antikörper/Oberflächenmarker-Interaktionen basierenden Fluoreszenz-Färbungen unterzogen. Die Antikörper (AK) waren zur Fluoreszenz-vermittelten Detektion entweder mit *fluorescein isothiocyanate* (FITC, grün), *anti-allophycocyanin* (APC, blau) oder *phycoerythrin* (PE, rot) markiert, um eine effiziente Kombination der Ansätze in den Reaktionsgefäßen bei der Detektion zu ermöglichen.

Vor den Färbungen wurden alle Ansätze mit *FcR-Blocking-Reagent* (1µl/45 µl, 10 min, 4 - 8 °C) geblockt, um das Gros an unspezifischen Bindungen vorab zu minimieren. Parallel hierzu konnten die entsprechenden AK schon in den Reaktionsgefäßen vorgelegt werden. Die eingesetzten AK der Firma *Miltenyi Biotec* waren: anti-CD11c-FITC/-APC (#130-102-466/-493), anti-MHC-II-APC (#130-102-139), anti-CD40-PE (#130-102-599), anti-CD80-PE (#130-102-613), anti-CD83-PE (#130-104-474), anti-CD86-APC (#130-102-558). Die prinzipiell auftretenden unspezifischen Bindungseffekte der AK wurden durch das Mitführen von Isotyp-Kontrollen und deren Subtraktion von den Ergebnissen korrigiert. Hierfür eingesetzt wurden: anti-hamster IgG-FITC/-PE/-APC, anti-rat IgG2a-PE, anti-rat IgG2b-APC und REA Control.

Die Ansätze wurden nach der Zugabe der Zellsuspension auf die vorgelegten AK gut durchmischt und für 20 min bei 4 – 8 °C im Dunkeln gelagert. Anschließend erfolgten das Waschen der Ansätze mit 1 - 2 ml PBS und die Zentrifugation mit 1000 x g für 5 min bei 4 °C. Nach der Entfernung der Überstände wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und gevortext. Schlussendlich folgte die Vermessung am FACSCalibur™. Die spezifischen Settings der Messung sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

2.5 Immunoassays – Detektionsverfahren zur Quantifizierung humoraler Faktoren in Zellmedien

2.5.1 Interleukin (IL)-12 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Basierend auf dem Kenntnisstand, dass Monozyten über humorale Faktoren – wie dem IL-12 – die T_H1-Zell-Aktivierung und Entwicklung beeinflussen können, wurden die am Tag 10 nach der Knochenmarksisolation weggefrorenen Medium-Überstände hinsichtlich ihres IL-12-Gehalts untersucht [52].

Hierfür wurde ein als ELISA bezeichnetes Antikörper-basiertes Nachweisverfahren eingesetzt. Im Gegensatz zum Radioimmunassay (RIA) zählt zwar auch der ELISA zur Gruppe der Immunassay-Verfahren, basiert jedoch auf enzymatisch gekoppelten Farbreaktionen und wird daher den enzymatischen Immunadsorptionsverfahren (EIA) zugeschrieben.

Die in dieser Arbeit verwendete Sandwich-ELISA-Technik der Firma *R&D Systems* bediente sich dabei zweier Antikörper, die beide spezifisch an das zu detektierende Antigen binden. Hierfür wurde zunächst der erste Antikörper (*capture antibody*) an die feste Phase einer 96-well Mikrotiterplatte in einer 24-stündigen Übernachtinkubation gebunden. Am darauffolgenden Tag wurde mit dem Auftragen der Proben begonnen. Dazu wurde zunächst der *capture antibody* durch Abkippen und gründlichem Abklopfen der Mikrotiterplatte auf einem Tuch entfernt und die *wells* anschließend mit je 400 µl Wasch-Puffer befüllt. Es folgten nach erneutem Abkippen und Abklopfen der Platte noch 3 weitere Waschschrte mit je 300 µl Wasch-Puffer. Danach wurden die *wells* durch Zugabe von *Blocking-Reagent* für 1 h bei RT geblockt, um unspezifischen Bindungen der folgenden Zugabe des Antigens vorzubeugen. Anschließend wurde das *Blocking-Reagent* analog dem *capture antibody* entfernt und die Platten erneut weiteren 3 Waschschrten unterzogen. Nun konnten je 100 µl der jeweiligen Proben auf die *wells* aufgetragen werden. Zur abschließenden Konzentrationsbestimmung des IL-12 in den Proben wurde eine Standard-Verdünnungsreihe mit festgelegten Konzentrationen des IL-12 mitgeführt. Alle Ansätze wurden über Nacht bei RT im Dunkeln inkubiert.

Am nächsten Tag konnten die Proben durch die Detektion des IL-12 ausgewertet werden. Hierfür wurde die Mikrotiterplatte erneut über dem Abfluss abgekippt, gründlich abgeklopft und den bereits geschilderten Waschschrten unterzogen, sodass nur der vom *capture antibody* gebundene Antigen-Komplex zurückblieb. Anschließend erfolgte die Zugabe eines zweiten spezifischen Antikörpers zur Detektion (*detection antibody*), der ein anderes Epitop erkennt und der nun ebenfalls an das zuvor vom *capture antibody* festgehaltene und gebundene IL-12 bindet.

Nach einer 2-stündigen Inkubation bei RT im Dunkeln folgten erneut 3 Waschschrte, um ein hohes Ausmaß reiner spezifischer Antikörper/Antigen-Bindungen zu gewährleisten. Anschließend wurden die *wells* mit je 100 µl einer Streptavidin-Lösung, an dessen Ende ein Reporterenzym gekoppelt war, für 20 min bei RT inkubiert. Das gekoppelte Reporterenzym setzt dabei in einer enzymatischen Reaktion ein Substrat unter einem Farbumschlag der Lösung zu einem Reaktionsprodukt um. Die Farbintensität bzw. die Signalstärke korreliert dabei mit der Anzahl an zuvor gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexen und bietet daher zuverlässige quantitative Nachweise des zu detektierenden Antigens. So wurde im Anschluss nach 3-maligem Waschen der *wells* je 100 µl einer Substrat-Lösung hinzugegeben und ebenfalls für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Um die enzymatische Reaktion zu beenden, wurden als letzter Schritt je 100 µl *stop solution* hinzu pipettiert und die Platten am ELISA-Reader vermessen. Die erhaltenen Werte konnten in Relation zu den mitgeführten Standard-Proben anhand einer Regressionsfunktion bzw. Eichgeraden ihren spezifischen IL-12 Konzentrationen zugeordnet werden. Die spezifischen Settings sind dabei dem Ergebnisteil zu entnehmen.

2.5.2 Biolegend's LEGENDplex™ Assay

Zusätzlich wurden die am Tag 10 nach der Knochenmarksisolation weggefrorenen Medium-Überstände hinsichtlich ihres Gehalts an anti-inflammatorisch wirksamen IL-10 und chemotaktisch wirksamen MCP-1 untersucht [40, 140].

Hierfür wurde ein als LEGENDplex™ Assay bezeichnetes – ebenfalls Antikörper-basiertes – Nachweisverfahren der Firma *BioLegend*® (San Diego, CA, USA) eingesetzt. Dieser Assay ist ein *bead*-basierter Immunoassay, der denselben Prinzipien anderer Sandwich-Immunoassays (ELISA-Assay s. 2.5.1) unterliegt, wobei der zwischen den beiden Antikörpern (*capture* und *detection antibody*) gebundene und gelöste Analyt nachfolgend flusszytometrisch vermessen wurde. Pro Ansatz können mit diesem Assay gleichzeitig bis zu 13 verschiedene spezifische Analyt/Antikörper-Bindungen detektiert und damit eine hohe Effizienz erzielt werden.

Der Assay wurde entsprechend des Hersteller-Manuals in 96-*well*-Platten durchgeführt. Die schlussendliche flusszytometrische Vermessung der Analyten mit dem *LEGENDplex Multi-Analyte Flow Assay*-Kit, erfolgte am FACSVerse der Firma *BD Bioscience*. Die Daten wurden anhand der LEGENDplex™ Datenanalyse-Software ausgewertet.

Die folgende Abbildung 3 (s. f. S. Abb. 3) veranschaulicht das Prinzip des LEGENDplex™ Assays anhand kurzer Skizzen und dient zur Erläuterung der Durchführung.

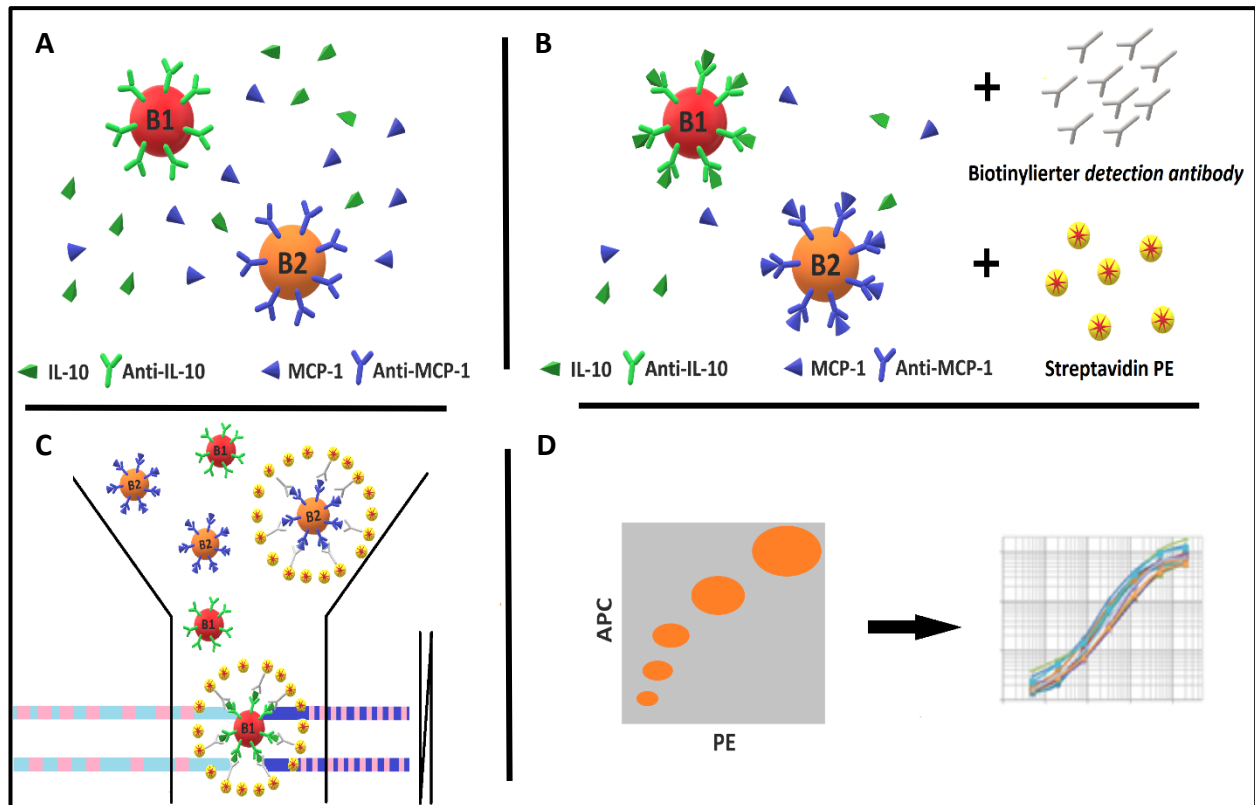


Abbildung 3: Prinzip des LEGENDplex™ Assays. A: Die bead-Populationen (B1, B2 etc.) sind mit unterschiedlichen Konzentrationen des Fluorochroms *anti-allophycocyanin* (APC) markiert, um sie klar voneinander unterscheiden zu können. Jeder bead ist auf seiner Oberfläche mit einem spezifischen Antikörper (*capture antibody*) gekoppelt. Die beads wurden mit den zu untersuchenden Mediumüberständen inkubiert, wobei jeder Analyt von seinem spezifischen *capture bead* gebunden wurde.

B: Nach dem Herunterwaschen nichtgebundener Bestandteile wurden die biotinylierten *detection antibodies* hinzugefügt, welche an ihre spezifischen Analyten binden, die bereits vom *capture antibody* gebunden waren (*capture bead/Analyt/detection antibody*-Sandwich). Anschließend wurde mit *phycoerythrin* (PE) markiertes Streptavidin hinzugefügt, das die biotinylierten *detection antibodies* bindet und so ein Fluoreszenzsignal vermittelt, welches anschließend flusszytometrisch quantifiziert wurde. Die Intensitäten der Fluoreszenzsignale sind dabei proportional zur Menge an gebundenem Analyten.

C: Für jede bead-Population wurde anschließend die PE-Fluoreszenzsignal-Intensität am Flusszytometer FACSVerse quantifiziert.

D: Die Konzentrationen jedes Analyten wurden mittel bereits bestehender standardisierter Eichgeraden innerhalb der LEGENDplex™ Datenanalyse-Software quantifiziert.

2.6 RNA-Isolation

Zur Untersuchung der Genexpression ist die Extraktion der Gesamt-RNA aus den Zellen erforderlich. Dafür wurde die *Trifast*®-Methode verwendet. Als Ausgangspunkt dienten die Zellen, die am Tag 10 nach der Knochenmarksisolation als Zellpellets bei -80 °C in einer Konzentration von ca. 1×10^6 weggefroren worden waren. Alle Pipettierschritte erfolgten mit speziellen RNA-Filter-Tips, um eine Kontamination der Spitzen mit RNA-abbauenden Enzymen auszuschließen.

Die schon zuvor abzentrifugierten weggefrorenen Zellpellets wurden in 300 µl Trizol aufgenommen. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurden die nun abgelösten und lysierten Zellen in zuvor beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgte die Durchmischung der Proben mittels Vortexen. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden je 50 µl Chloroform hinzugegeben. Wiederum wurde das Lysat gevortext und für 10 bis 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 15 min bei maximaler Umdrehung und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Es bildete sich eine dreiphasige Schichtung aus. Die obere und farblose Phase mit der Gesamt-RNA wurde abpipettiert und wiederum in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nun wurden 125 µl Isopropanol hinzu pipettiert, was die Ausfällung der RNA auslöste. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße erneut gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Es erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei maximaler Umdrehung und 4 °C. Dabei bildete sich ein weißes Pellet am unteren Rand der Reaktionsgefäße aus.

Der Überstand wurde verworfen und die RNA mit 1 ml 75%-igem Ethanol (mit DEPC-Wasser verdünnt) gewaschen, wiederum alles miteinander gemischt und für 5 min bei maximaler Umdrehung und 4 °C erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde nun vollständig entfernt und das sich unten am Boden des Reaktionsgefäßes befindliche RNA-Pellet getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und für 10 min bei 65 °C erhitzt. Bis zur weiteren Aufbereitung wurde die RNA bei -80 °C weggefroren.

2.7 DNase-Verdau und Qualitätskontrolle der RNA

Zum Ausschluss von DNA-Kontaminationen der zuvor gewonnen RNA wurden die Proben einem DNase-Verdau unterzogen. Dafür wurde ein *DNase-free*-Kit von Ambion verwendet. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Zu den RNA-Proben wurden je 2 µl DNase-Puffer (10x) und 1 µl rDNase hinzugegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation der Proben bei einer Temperatur von 37 °C. Zum Beenden der Reaktion wurden je 2 µl DNase Inaktivator zu jedem Ansatz hinzugegeben. Nach einer

2-minütigen Inkubation bei 25 °C unter leichtem Schütteln (600 rpm) wurden die Reaktionsgefäße schließlich für 1,5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden mindestens 20 µl in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und am Photometer die Konzentration der reinen RNA bestimmt.

Zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurden die Proben nach der Konzentrationsbestimmung auf Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Agarose ist ein aus *D-Galaktose* und *3,6-Anhydro-L-Galaktose* glykosidisch verbundenes Polysaccharid und wird aus den Rotalgengattungen *Gelidium* und *Gracillaria* gewonnen. Dieses Polysaccharid enthält im Gegensatz zum Agar sehr viel weniger negative Ladungen und ist als starker Gelbildner für die Gelierfähigkeit des Agar verantwortlich. Durch das Aufkochen der Agarose in TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer (0,5-fach), bestehend aus TRIS Base + Borsäure + EDTA-Na₂) wird ein Agarose-Gel hergestellt, das je nach Konzentration des Polysaccharids in seiner späteren Porengröße variiert werden kann [59].

In dieser Arbeit wurden 1 %-ige Gele zur Auftrennung der RNA verwendet, welche einen Bereich von 500 bis 10.000 bp großen Molekülen abdecken. Hierfür wurden 1,5 g Agarose (Biozym) mit 150 ml TBE-Puffer (in DEPC-Wasser) im Erlenmeyerkolben unter wiederholtem Schwenken in der Mikrowelle bis zum Aufkochen erhitzt. Vor dem ca. 15-minütigen Abkühlen der Lösung wurden 7,5 µl *Roti®-Safe GelStain* – ein Fluoreszenzfarbstoff zum Sichtbarmachen von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen – hinzugefügt. Die abgekühlte Lösung wurde in die bereits vorgefertigten mit Autoklavierband abgeklebten und mit Auftragskämmen versehenen Schlitten der Elektrophoresekammern gegossen. Anschließend polymerisierten die Gele für ca. 30 min unter einem Abzug vollständig aus.

Zuletzt wurden die Schlitten nach Entfernung des Klebebandes und der Kämmen in die mit ausreichend TBE-Puffer befüllten Elektrophoresekammern eingelegt. Danach wurden die Taschen der Gele mit je 15 µl der jeweiligen RNA-Probe (12 µl Probe + 3 µl Lauf-Puffer) beladen und die RNA anschließend durch das Anlegen einer Spannung von 100 V für etwa 1 h im elektrischen Feld in Richtung der Anode aufgetrennt.

Die Abbildung 4 zeigt beispielhaft das Bild eines Agarose-Gels mit elektrophoretisch aufgetrennter RNA. Die Sichtbarmachung der Banden erfolgte mittels *Roti®-Safe GelStain* unter UV-Licht. Die deutlich erkennbaren Banden der 18S und 28S RNA belegen, dass die RNA intakt und nicht degradiert war, so dass sie für die Expressionsanalysen verwendet werden konnte.

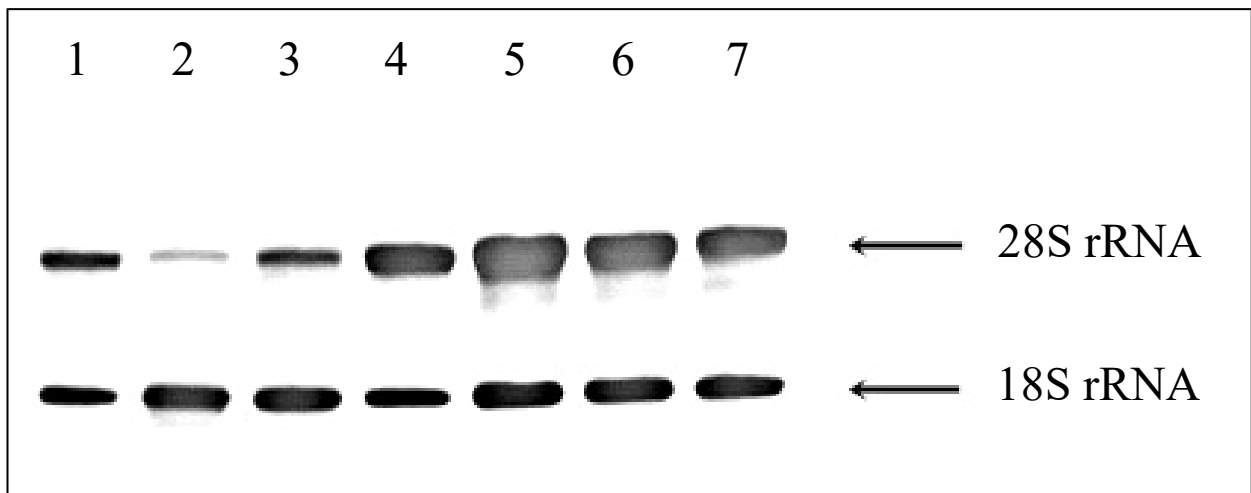


Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung einer RNA-Gelelektrophorese. 1 % Agarosegel, 1 h bei 100 V; Banden 1 – 7: RNA- Proben von MRL/MpJ und CAST/EiJ-Mäusen; Kennzeichnung der unteren 1.8 kb-Banden der 18S rRNA sowie der oberen 2.8 kb-Banden der 28S rRNA (dominante RNA Spezies in eukaryotischen Zellen).

2.8 Reverse Transkription

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (RT-PCR) kommen ausschließlich DNA-Polymerasen zum Einsatz. Daher musste die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden, um überhaupt als Reaktionstemplate dienen zu können. Für die RT-PCR wurde ein Kit von Applied Biosystems eingesetzt. Es wurde ein 0,25 µg RNA entsprechendes Volumen der Proben in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und auf 10 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Hinzu kamen jeweils 10 µl Mastermix, der sich wie folgt zusammensetzte:

2 µl 10 x RT-Puffer

0,8 µl dNTPs

2 µl *Random Hexanucleotide* Primers

1 µl Reverse Transkriptase

4,2 µl DEPC-H₂O

Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße zunächst für 10 min bei 25 °C und anschließend bei 37 °C für 2 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Hitzeinaktivierung bei 85 °C für 5 min. Die so gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.9 TaqMan-PCR (qRT-PCR)

Das Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR beruht auf dem der klassischen PCR, mit dem Unterschied, dass die qRT-PCR präzise quantitative Aussagen über die zuvor gewonnenen mRNA-Mengen ermöglicht ^[59].

Zusätzlich zum Primerpaar, welches den Amplifikationsbereich determinierte, wurde eine mit einem Donor-(Reporter-) und einem Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) markierte Sonde eingesetzt, die in dem gewünschten und genspezifischen Bereich bindet. Am 5' Ende befand sich der Reporter- und am 3' Ende der Quencher-Fluorophor. Der durch eine Lichtquelle angeregte Reporter gibt einen Teil seiner Energie an den in ausreichender Nähe befindlichen Quencher ab. Reduziert sich der Abstand, so nimmt bei gleichzeitiger Zunahme der Fluoreszenzintensität des Reporters das Fluoreszenzsignal des Quenchers ab. Wenn die Taq-Polymerase, welche eine 5'-3'-Exonuclease-Aktivität besitzt, während der Synthese des Gegenstranges der cDNA bei ihrer Replikation die Sonde am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch auch der Quencher- und Reporter-Fluorophor voneinander. Die steigende Reporter-Fluoreszenz kann am Ende der Elongations-Phase eines jeden Zyklus gemessen werden. Dafür wurden die Farbstoffe mit einem Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittierten ihrerseits wiederum Licht einer Farbstoff-spezifischen Wellenlänge. Nach Abbau der Sonde am Gegenstrang durch die Taq-Polymerase änderte sich auch die Wellenlänge des vom Reporterfluorophor emittierten Lichtes. Die Signalintensität dieses Lichtes ist dabei proportional zur Konzentration der amplifizierten cDNA ^[33, 59].

In der exponentiellen Phase der PCR konnte ein signifikanter Anstieg des Signals beobachtet werden. Dieser erlaubt es, Rückschlüsse auf die ursprüngliche mRNA-Konzentration zu ziehen. Zum Abgleich der Unterschiede in der Gesamtmenge der RNA wurde als *Housekeeping*-Gen *Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase* (HPRT) eingesetzt. Für die Durchführung der qRT-PCR wurden genspezifische Primer-Sonden-Gemische (*Assays on Demand*) von Applied Biosystems verwendet. Die zu analysierende cDNA wurde zuvor 1:2 mit DEPC-H₂O verdünnt. In einer 96-well Mikrotiterplatte wurden anschließend jeweils 2,5 µl der cDNA und 10 µl eines Mastermix pipettiert, der sich wie folgt zusammensetzte:

0,625 µl *Assay on Demand* Primer-Sonden-Gemisch

3,125 µl DEPC-H₂O

6,25 µl TaqMan Mastermix

Im Anschluss wurde die Platte mit einer Folie beklebt, welche vor dem Verdunsten der Proben schützen sollte, und kurz anzentrifugiert. Nach folgendem Algorithmus wurde der TaqMan *Cycler Viiia 7* der Firma Thermo Fischer Scientific gestartet:

1 x 95 °C für 10 min

95 °C für 15 sec und anschließend 60 °C für 1 min (45 Zyklen)

Für jede Probe wurden je nach technischer Möglichkeit 3-fach Bestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte nach der ΔC_t -Methode mittels der *Viiia 7* Gerätesoftware, wobei die relative Menge an Target-RNA durch $2^{-(\Delta C_t)}$ ausgedrückt und über die Formel $\Delta C_{t_{\text{target}}} = C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{hprt}}}$ errechnet wurde.

2.10 Statistik

Sämtliche Daten wurden mit der *IBM SPSS Statistics 22.0*-Software statistisch ausgewertet und verarbeitet. Die Werte wurden als arithmetische Mittel \pm dem Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean* = SEM) für die angegebene Anzahl der unterschiedlichen Proben in den jeweiligen Experimenten ausgedrückt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe parametrischer Tests zum Vergleich der Mittelwerte mehrerer Gruppen – so zunächst mit einer Varianzanalyse („einfaktorielle-ANOVA“) – untersucht, an die sich eine „Bonferroni-Korrektur“ als *post-hoc* Test anschloss. Erfüllten die Daten nicht die Annahmen für eine ANOVA, so wurde die Varianz zunächst durch den Kruskal-Wallis-Test untersucht, bevor einzelne Untergruppen gebildet und mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests auf ihre Signifikanz getestet wurden. In allen Fällen wurde ein P-Wert $< 0,05$ (Bonferroni-korrigiert) als statistisch signifikant betrachtet. Eine genaue Information über die jeweils verwendeten Tests ist den Abbildungen im Ergebnisteil zu entnehmen.

Konkret erfolgten Untergruppenvergleiche zwischen CAST/EiJ-, älteren (erkrankten) MRL/MpJ- und zusätzlich jüngeren (gesunden) MRL/MpJ-Mäusen (bereits aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe des Doktoranden gewonnene Datensätze, die hier nicht gezeigt werden), auch wenn in den Abbildungen letztendlich nur die Signifikanzen zwischen CAST/EiJ- und MRL/MpJ-Mäusen gezeigt werden.

3 Ergebnisse

3.1 BrdU

Die GM-CSF- und LPS-Effekte auf das Wachstum *in vitro* generierter dendritischer Zellen wurden in einem BrdU-Einbauassay erfasst (Abb. 5 A/B). Die folgende Abbildung 5 A soll dabei zunächst als Übersichtsgrafik dienen, die Tendenzen aufzeigen und einen Gesamtüberblick der GM-CSF- und LPS-Wirkungen auf die DNA-Synthese der *in vitro* generierten cDCs geben. Eine statistische Auswertung der Daten erfolgte an dieser Stelle noch nicht.

Prinzipiell zeigte sich bei beiden Mausstämmen die Tendenz, dass höhere GM-CSF-Konzentrationen mit einer erhöhten BrdU-Einbaurrate einhergingen, was für eine gesteigerte DNA-Synthese und Proliferation der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollansätzen spricht. Die Proben, die zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen von LPS kultiviert wurden, waren hingegen mit einem reduzierten Einbau des BrdU in die cDCs assoziiert (Abschn. II-IV).

Diese Einflüsse beider Stoffe auf die DNA-Synthese waren in Bezug auf die beiden Mausstämme unterschiedlich stark ausgeprägt. Sie zeigten sich vor allem in den verschiedenen kombinierten Stimulationen der Kulturen mit GM-CSF und LPS noch wesentlich deutlicher.

cDCs des CAST/EiJ-Stammes wiesen dabei die größere GM-CSF- als auch LPS-Responsibilität auf. Die BrdU-Einbaurrate dieser Zellen lag unter der reinen GM-CSF-Stimulation konzentrationsabhängig deutlich über der von MRL/MpJ-Mäusen (Abschn. I/1-4). Bereits die geringste Dosis an LPS (0,01 µg/ml) führte dazu die DNA-Synthese auf das Ausgangsniveau der Kontrollansätze zu senken. Auch die erneute stufenweise Erhöhung der GM-CSF-Konzentration konnte die LPS-Wirkung nicht kompensieren (Abschn. II-IV/1-4). Weitere Erhöhungen der LPS-Konzentration auf bis zu 1 µg/ml ließen den Einbau von BrdU in die Zellen unwesentlich weiter sinken und bestätigten einen konzentrationsunabhängigen LPS-Effekt (Abschn. IV/1-4).

cDCs des MRL/MpJ-Stammes zeigten dabei ein qualitativ gleichartiges Reaktionsprofil, wenn auch die Höhe der Absolutwerte und die damit verbundenen Differenzen geringer ausfielen. Die cDCs dieses Stammes waren weitaus weniger GM-CSF-responsibel. Sie konnten ihre DNA-Synthese unter LPS-freien Bedingungen und bei höchster GM-CSF-Stimulation gerade einmal verdoppeln (Abschn. I/4). Die geringste Dosis an LPS (0,01 µg/ml) ließ auch hier die DNA-Synthese der Zellen auf das Ausgangsniveau des Kontrollansatzes sinken, blieb jedoch stets konstant über der von Zellen des CAST/EiJ-Mausstammes (Abschn. II/1-4). Gesteigerte Konzentrationen des GM-CSF vermochten auch hier den LPS-Effekt nicht suffizient zu kompensieren. Höhere Konzentrationen des Endotoxins ließen den BrdU-Einbau eher noch bis unter das Ausgangsniveau der Kontrollansätze sinken (Abschn. II/1-4).

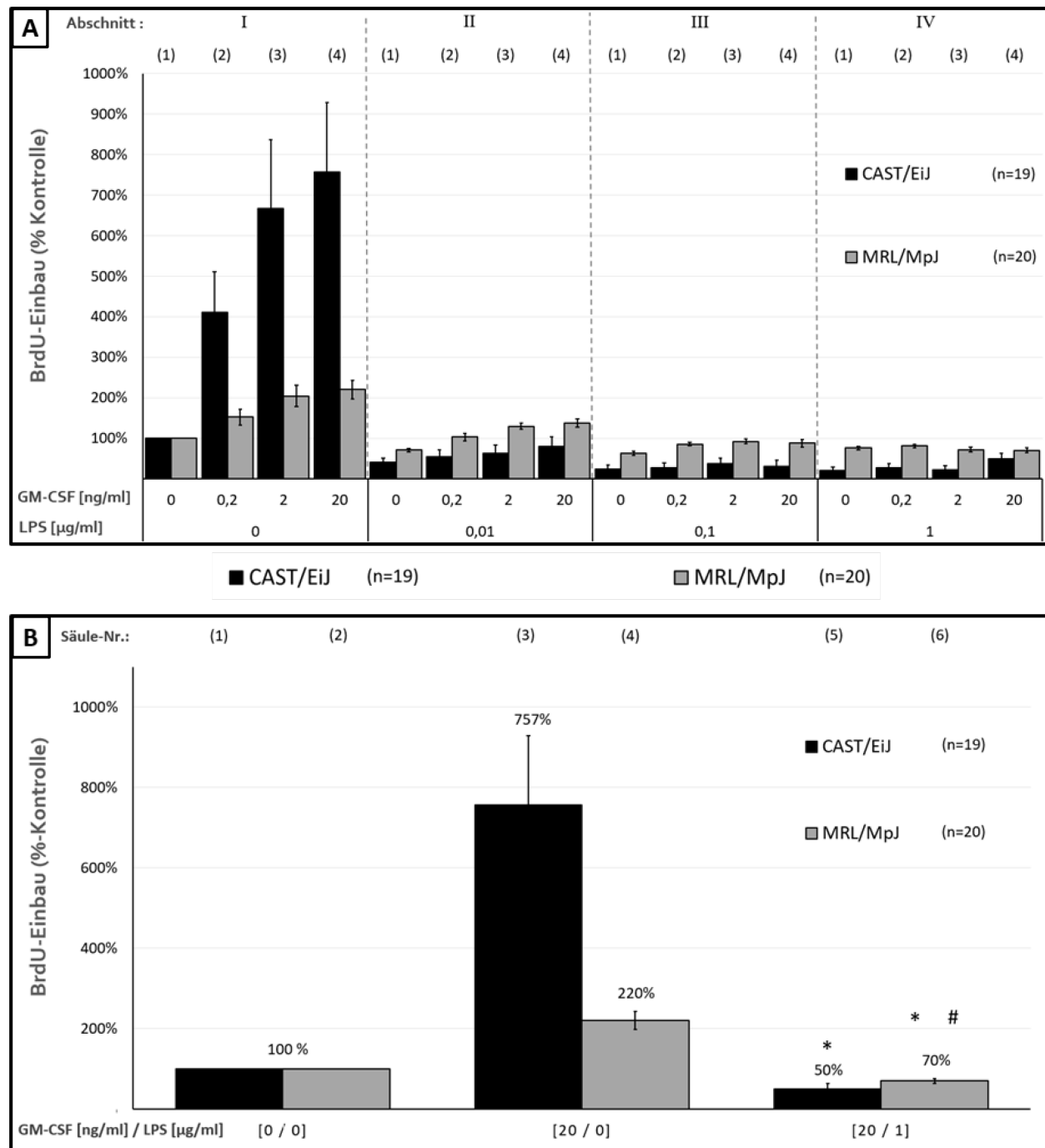


Abbildung 5: A: Einfluss unterschiedlicher GM-CSF- und LPS-Konzentrationen auf die DNA-Syntheserate der cDCs. Für den Versuch wurden die Zellen am Tag 9 nach der Knochenmarksisolation mit den angegebenen Kombinationen aus GM-CSF und LPS für 24 h in 96-well-half-area-Platten (Zellzahl: 3×10^5 /ml) kultiviert. Am folgenden Tag wurde BrdU hinzupipettiert und die Inkubation für weitere 24 h fortgesetzt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung des BrdU-Einbaus nach Herstellerangaben. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ($n \geq 19$) \pm SEM. 100 % BrdU-Einbau entsprechen den cDCs ohne GM-CSF- und LPS-Stimulation.

B: Einfluss von LPS auf die DNA-Syntheserate der cDCs unter höchster Wachstumsfaktor-Stimulation. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ($n \geq 19$) \pm SEM. 100 % BrdU-Einbau entsprechen den cDCs ohne Wachstumsfaktorstimulation. * $P < 0,05$ im Vergleich zu identisch kultivierten cDCs derselben experimentellen Gruppe ohne LPS; # $P < 0,05$ im Vergleich zu identisch kultivierten cDCs von CAST/EiJ Mäusen.

Diese Ergebnisse untersetzt die folgende Abbildung 5 B noch einmal im Detail. Sie fasst den Einfluss von LPS auf die BrdU-Einbauraten mit konkreten signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Mausstämmen graphisch zusammen.

Erneut werden in der Abb. 5 B die unterschiedlich starken GM-CSF-Responsibilitäten beider cDC-Kohorten ersichtlich (Säulen 3, 4). cDCs von CAST/EiJ-Mäusen zeigten mit ihrer Steigerung der DNA-Synthese auf das bis zu 7-fache des Ausgangswertes unter der höchsten GM-CSF-Stimulation das beste Ansprechverhalten (Abb. 5 B, Säule 3). Nach der Zugabe von LPS fiel mit der drastischen Abnahme des BrdU-Einbaus in die Zellen dieses Mausstammes die überaus starke Responsibilität gegenüber diesem Endotoxin auf (Säule 5). Der Abfall der DNA-Synthese reichte bis unter das Niveau nicht stimulierter Kontrollansätze und führte zu signifikanten Unterschieden, sowohl gegenüber der LPS-freien Kultivierung als auch im Vergleich zu MRL/MpJ-Mäusen.

Deren cDCs wiederum folgten einem ähnlichen Trend. Der BrdU-Einbau in die cDCs konnte ebenfalls durch GM-CSF gesteigert werden (Säule 4). Die Zugabe von LPS führte anschließend auch hier zu einem signifikanten Abfall der DNA-Synthese bis unter das Niveau nicht stimulierter Kontrollansätze (Säule 6). Unter diesen Bedingungen inkorporierten cDCs des MRL/MpJ-Mausstammes jedoch immer noch signifikant mehr BrdU als Zellen von CAST/EiJ-Mäusen (Säulen 5, 6).

Auch wenn sich die cDCs beider Mausstämme in ihren Reaktionsprofilen gegenüber den GM-CSF- und LPS-Wirkungen ähnelten, wurden vor allem quantitative signifikante Unterschiede beider Kohorten ersichtlich.

3.2 FACS

Die aus dem Knochenmark isolierten und *in vitro* mit GM-CSF generierten cDCs wurden zur Charakterisierung ihrer Funktionszustände bei An- und Abwesenheit von LPS einer Fluoreszenz-vermittelten Detektion DC-spezifischer Oberflächen-Marker unterzogen. Die Zellen der beiden Maus-Kohorten wurden immer auf ihren Oberflächenbesatz mit CD11c – einem DC-charakterisierenden Transmembranprotein – getestet, um die Gesamtanteile der in den Proben enthaltenen cDCs zu ermitteln ^[22]. Des Weiteren erfolgte die Detektion der DC-typischen Oberflächen-Marker CD40, CD80, CD83, CD86 und MHC-II. In der Ergebnisauswertung wurden die Anteile der CD11c/DC-Oberflächen-Marker doppelt positiven Zellen in Relation zu allen CD11c-positiv getesteten Zellen gesetzt, um ausschließlich mögliche Veränderungen der reinen cDCs zu betrachten. Die folgenden Abbildungen 6-10 A/B stellen die Ergebnisse in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit des LPS für jeden Oberflächen-Marker dar.

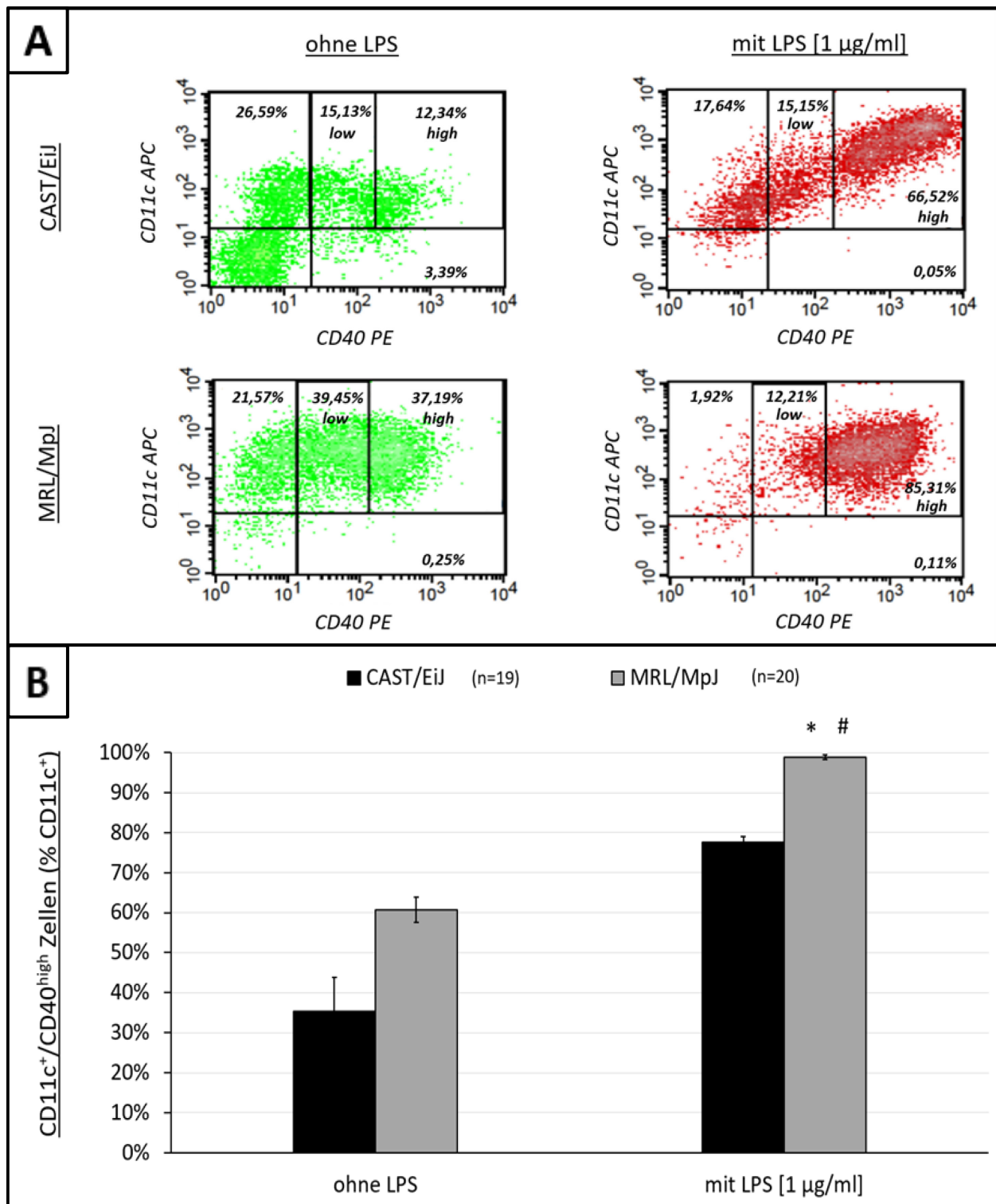


Abbildung 6 A/B: Charakterisierung von cDCs via Durchflusszytometrie: Ko-Expression von CD11c und CD40. Für diesen Versuch wurden Zellen an Tag 9 nach der Knochenmarksisolation verwendet und ohne bzw. mit LPS [1 µg/ml] für 24 h in 6-well-Platten (Zellzahl: 3×10^5 /ml) kultiviert. Die Expression der Oberflächen-Proteine CD11c und CD40 wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A): repräsentative Dotplots der Flusszytometrischen Untersuchungen aller Gruppen und Kulturbedingungen. (B): Anteil CD11c⁺/CD40^{high} doppelt positiver Zellen in Relation zu allen CD11c-positiven Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n \geq 19$) \pm SEM. *P < 0,05 im Vergleich zu identisch kultivierten cDCs derselben experimentellen Gruppe ohne LPS; #P < 0,05 im Vergleich zu identisch kultivierten cDCs von CAST/EiJ Mäusen.

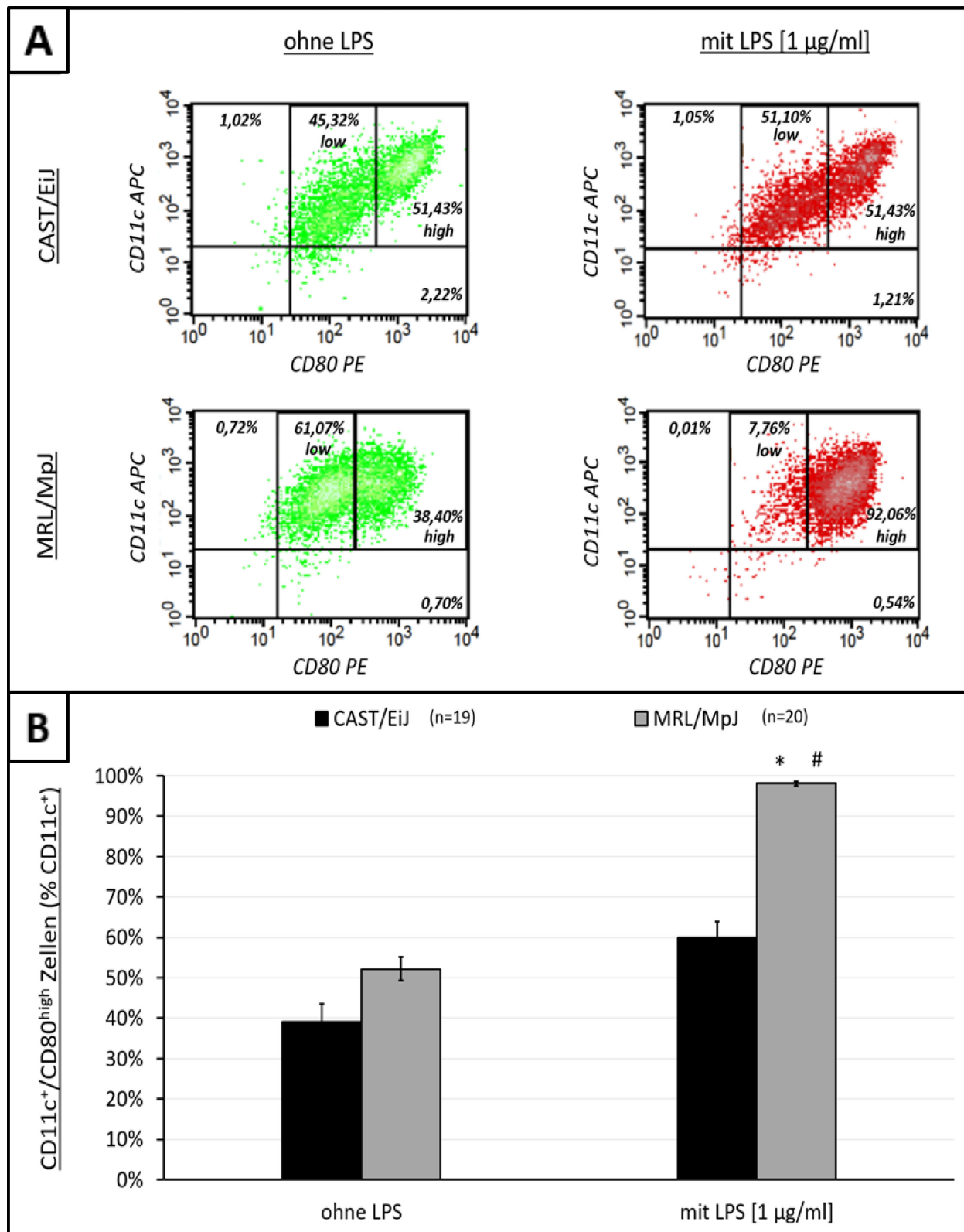


Abbildung 7 A/B: Charakterisierung cDCs via Durchflusszytometrie: Ko-Expression von CD11c und CD80.

Experimentelle sowie statistische Auswertungsdetails s.o. Abb. 4.

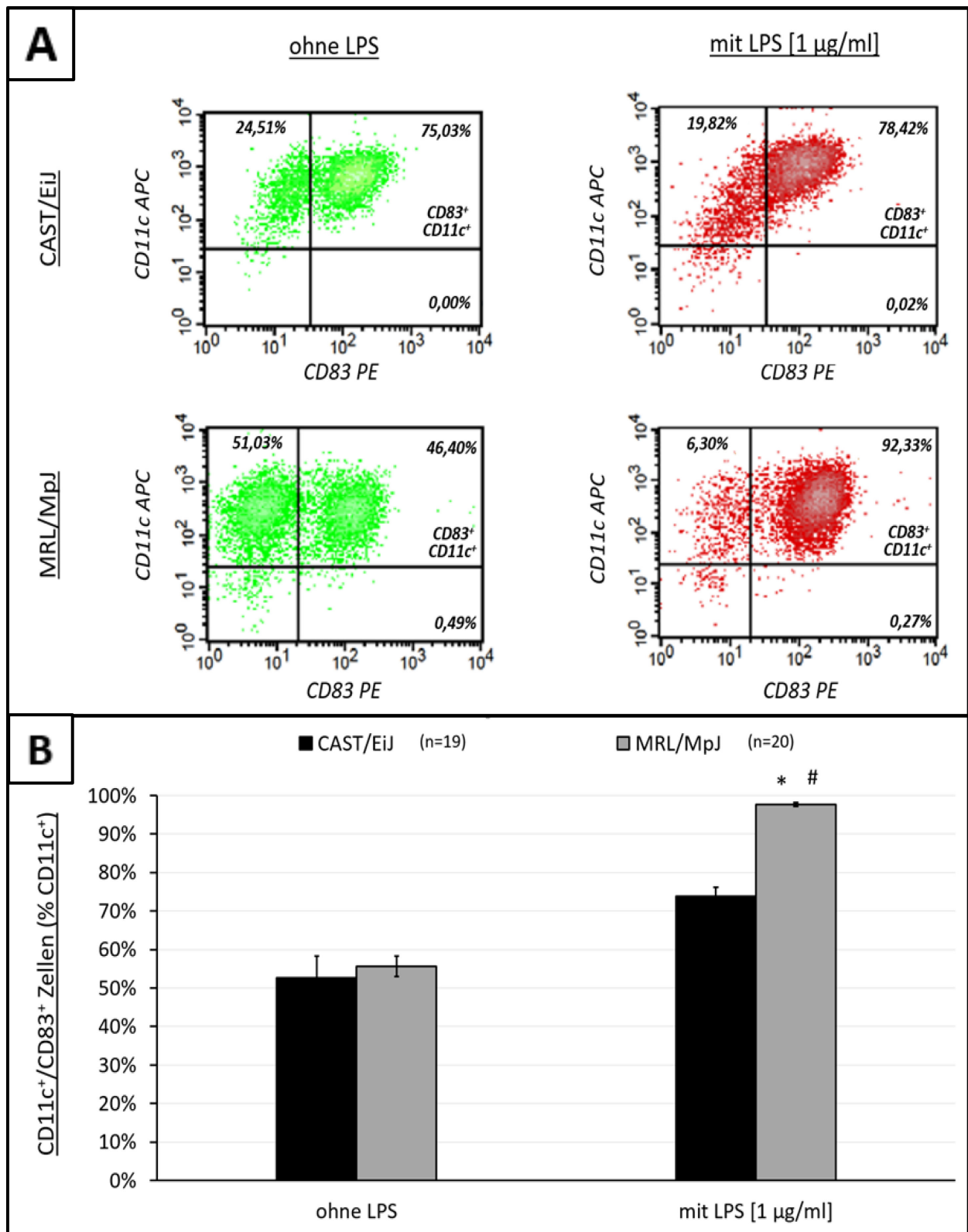


Abbildung 8 A/B: Charakterisierung cDCs via Durchflusszytometrie: Ko-Expression von CD11c und CD83.

Experimentelle sowie statistische Auswertungsdetails s.o. Abb. 4.

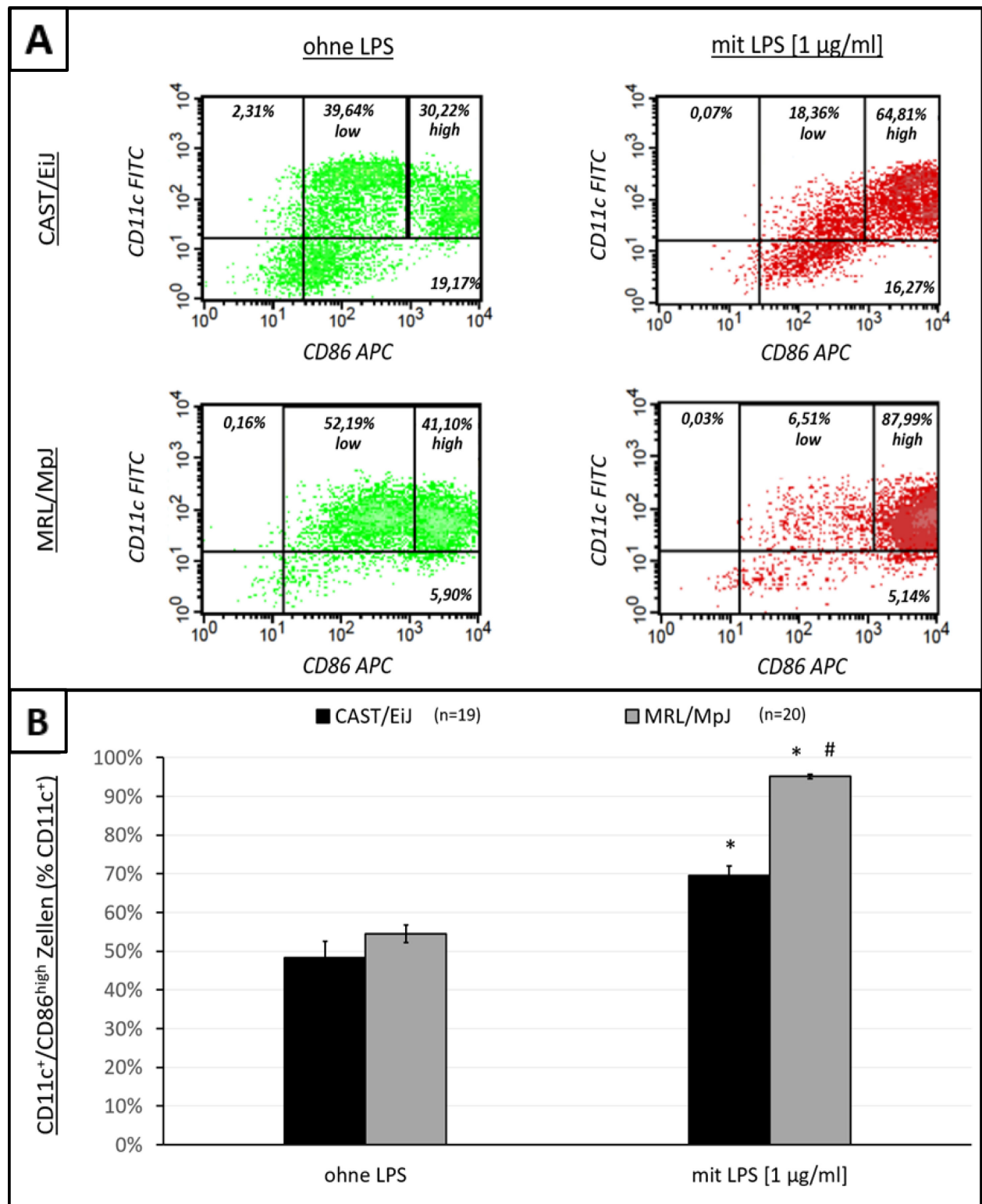


Abbildung 9 A/B: Charakterisierung cDCs via Durchflusszytometrie: Ko-Expression von CD11c und CD86.
Experimentelle sowie statistische Auswertungsdetails s.o. Abb. 4.

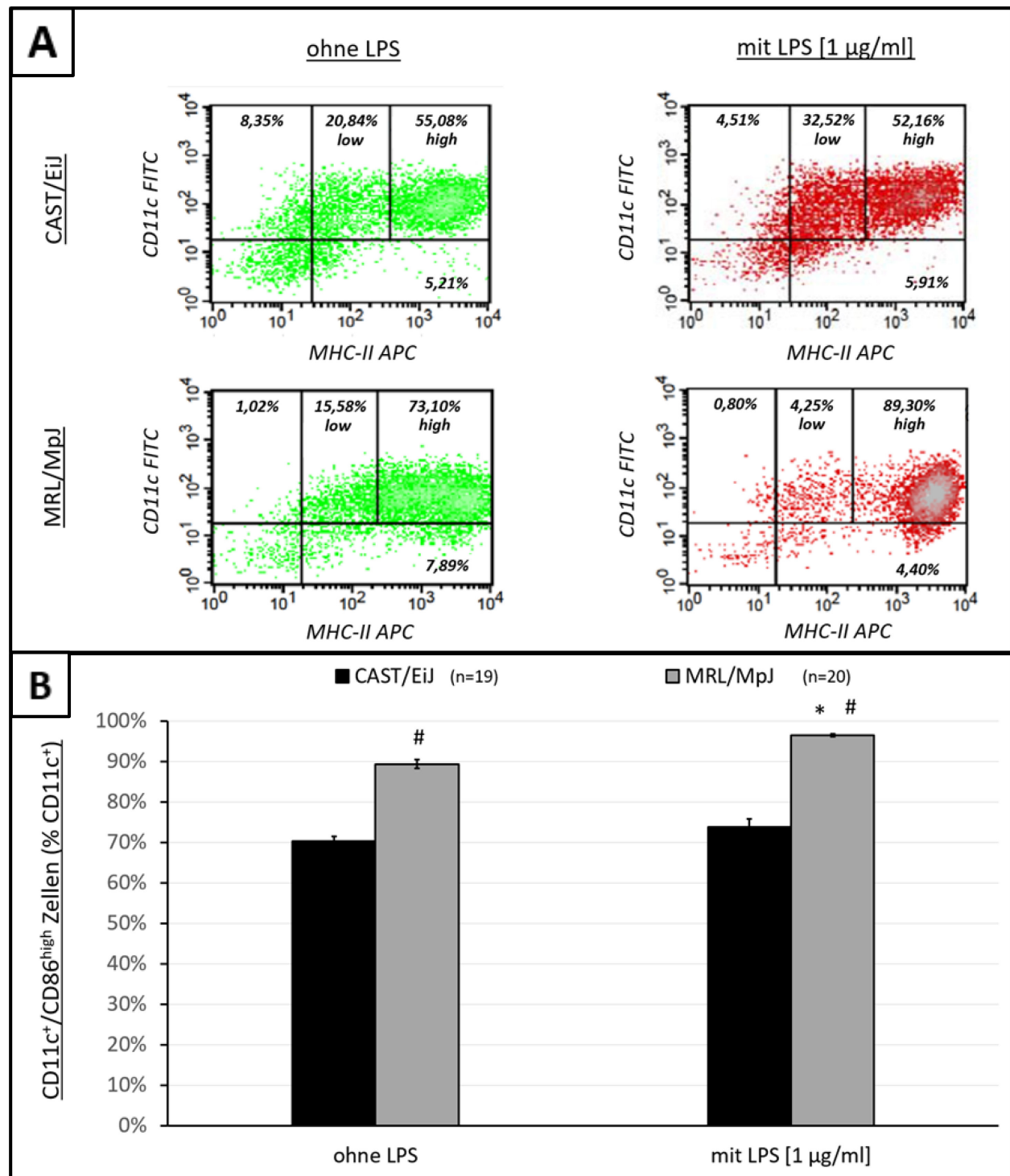


Abbildung 10 A/B: Charakterisierung von cDCs via Durchflusszytometrie: Ko-Expression von CD11c und MHC-II. Experimentelle sowie statistische Auswertungsdetails s.o. Abb. 4.

Bei CD40, CD80, CD86 und MHC-II ergab die durchflusszytometrische Analyse Belege für die Existenz von Subpopulationen, die den jeweiligen Oberflächenmarker unterschiedlich stark exprimierten. Für die quantitativen Ergebnisauswertungen wurde anschließend nur die Zellpopulation „high“ selektiert und betrachtet.

Grundsätzlich exprimierten alle CD11c-positiven Zellen beider Mauskohorten die DC-typischen Oberflächenmarker CD40, CD80, CD83, CD86 und MHC-II. Bezüglich der Verhältnisse doppelt positiver Zellen zu allen CD11c-positiven Zellen fielen jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Maus-Kohorten auf.

Zunächst waren unter LPS-freien Bedingungen die Anteile CD11c/CD40^{high}, CD11c/CD83, CD11c/CD80^{high} und CD11c/CD86^{high} doppelt positiver Zellen in den Kulturen der MRL/MpJ-Mäuse im Vergleich zu Zellen des CAST/EiJ-Mausstammes tendenziell, aber ohne statistische Signifikanz, höher (Abb. 6-9, Säulen 1, 2). Lediglich die Anteile CD11c/MHC-II doppelt positiver Zellen zeigten statistisch signifikante Unterschiede beider Maus-Kohorten: Es konnten mehr cDCs aus MRL/MpJ-Mäusen, als Zellen aus CAST/EiJ-Mäusen doppelt positiv getestet werden (Abb. 10, Säulen 1, 2).

Die Anwesenheit von LPS führte in den meisten Proben zu einem prozentualen Anstieg doppelt positiver CD11c/DC-Oberflächen-Marker tragender Zellen (Säulen 3, 4 in allen Abb.). Besonders in den cDC-Kulturen der MRL/MpJ-Mäuse führte die Zugabe von LPS zu einem starken Anstieg des Anteils CD11c-positiver Zellen, die gleichzeitig den Reifungs-Marker CD83 exprimierten (Abb. 8 B). Ein prozentual statistisch signifikanter Anstieg CD11c/CD40^{high}, CD11c/CD80^{high} und CD11c/CD86^{high} doppelt positiver Zellen konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 6, 7, 9 B). Hingegen wiesen die mit LPS behandelten Zellkulturen des CAST/EiJ-Mausstammes nur einen geringen Anstieg des Anteils doppelt positiver Zellen ohne jegliche statistische Signifikanz für die meisten untersuchten Oberflächen-Marker-Kombinationen auf (Abb. 6-9 B). Lediglich bei der Analyse CD11c/CD86^{high} doppelt positiver Zellen konnte eine geringe Steigerung statistisch belegt werden (Abb. 9 B).

Der Oberflächen-Marker MHC-II unterschied sich in seinem Expressionsprofil erneut von den anderen bereits betrachteten Markern (Abb. 10 B). Nach der Zugabe von LPS gab es bei den Zellen des CAST/EiJ-Mausstammes keine signifikanten Veränderungen. Die cDCs des MRL/MpJ-Mausstammes hingegen konnten noch einmal ihren doppelt positiven Anteil unter LPS-Stimulation signifikant erhöhen, obwohl sie schon auf einem hohen Niveau unter LPS-freien Bedingungen gestartet waren.

In der Gesamtschau exprimierten cDCs des MRL/MpJ-Mausstammes vor allem nach LPS-Stimulation von allen Oberflächenmarkern mehr als Zellen des CAST/EiJ-Mausstammes und erreichen dadurch einen offenbar höheren Ausreifungsgrad. Unter LPS-freien Bedingungen liegen beide Kohorten etwa gleich auf, was eine starke Ausreifungsfähigkeit der cDCs von MRL/MpJ-Mäusen zusätzlich unterstreicht.

3.3 IL-12 ELISA und LEGENDplex™-Assays

Zum näheren Verständnis der Aktivitätszustände der verschiedenen cDC-Populationen wurden die Mediumüberstände hinsichtlich ihres IL-12-Gehalts untersucht.

Die folgende Abbildung 11 zeigt die in den Medium-Überständen detektierten IL-12-Konzentrationen der verschiedenen cDC-Populationen in Abhängigkeit von der Präsenz des Stimulationsfaktors LPS.

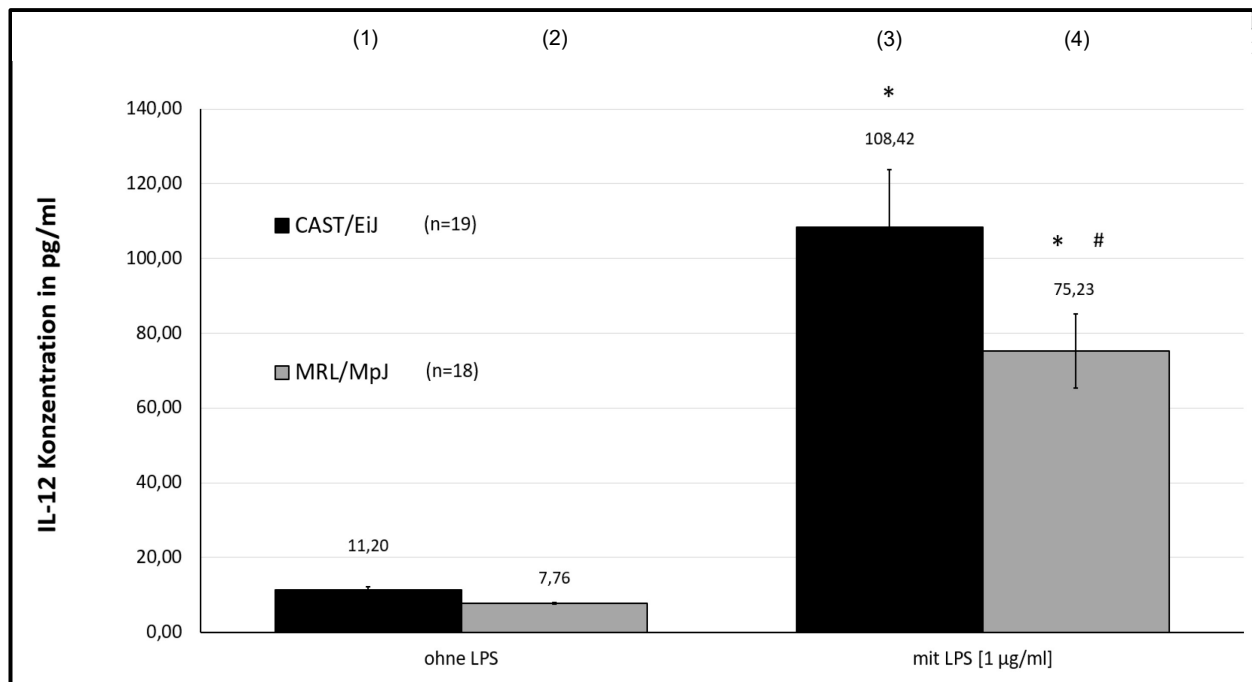


Abbildung 11: LPS-Effekte auf die IL-12-Konzentrationen in cDC-Kulturüberständen. Die am Tag 10 nach der Knochenmarksisolation und alleinigen Routinekultivierung mit GM-CSF [20 ng/ml] – sowie zum Teil zusätzlicher LPS-Stimulation [1 µg/ml] – gewonnenen Medium-Überstände wurden für diesen Versuch verwendet. Die IL-12-Konzentrationen der Überstände wurden mittels der Sandwich-ELISA-Technik eines Kits der Firma R&D Systems detektiert und nach anschließender Regression mitgeführter Standardproben mithilfe einer Eichgeraden vermessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ($n \geq 19$) \pm SEM der IL-12-Konzentrationen der Medium-Überstände ohne und mit LPS-Stimulation. * $P < 0,05$ im Vergleich identisch kultivierter cDCs desselben Stammes ohne LPS, # $P < 0,05$ im Vergleich identisch kultivierter cDCs von CAST/EiJ Mäusen.

Bei beiden Mausstämmen konnten weitaus niedrigere IL-12 Spiegel in den Überständen der LPS-freien Kulturmedien detektiert werden (Abb. 11, Säulen 1, 2). Auch ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mauskohorten feststellen, wenngleich die cDCs der CAST/EiJ-Mäuse mit ihren Werten tendenziell höher lagen.

In den Mediumüberständen der mit LPS kultivierten Proben konnten dann bei beiden Stämmen signifikant höhere IL-12-Spiegel nachgewiesen werden. Dabei lagen die IL-12-Konzentrationen der cDC-Kulturen von CAST/EiJ-Mäusen im Mittel signifikant höher als die der cDC-Kulturen aus MRL/MpJ-Mäusen (Säulen 3, 4).

In den Mediumüberständen wurde darüber hinaus der Gehalt an IL-10 bestimmt, einem immunsupprimierenden und antiinflammatorischen Interleukin ^[40].

Die folgende Abbildung 12 zeigt dabei analog der Abbildung 11 die in den Medium-Überständen detektierten IL-10-Konzentrationen der verschiedenen cDC-Populationen in Abhängigkeit von der Präsenz des Stimulationsfaktors LPS.

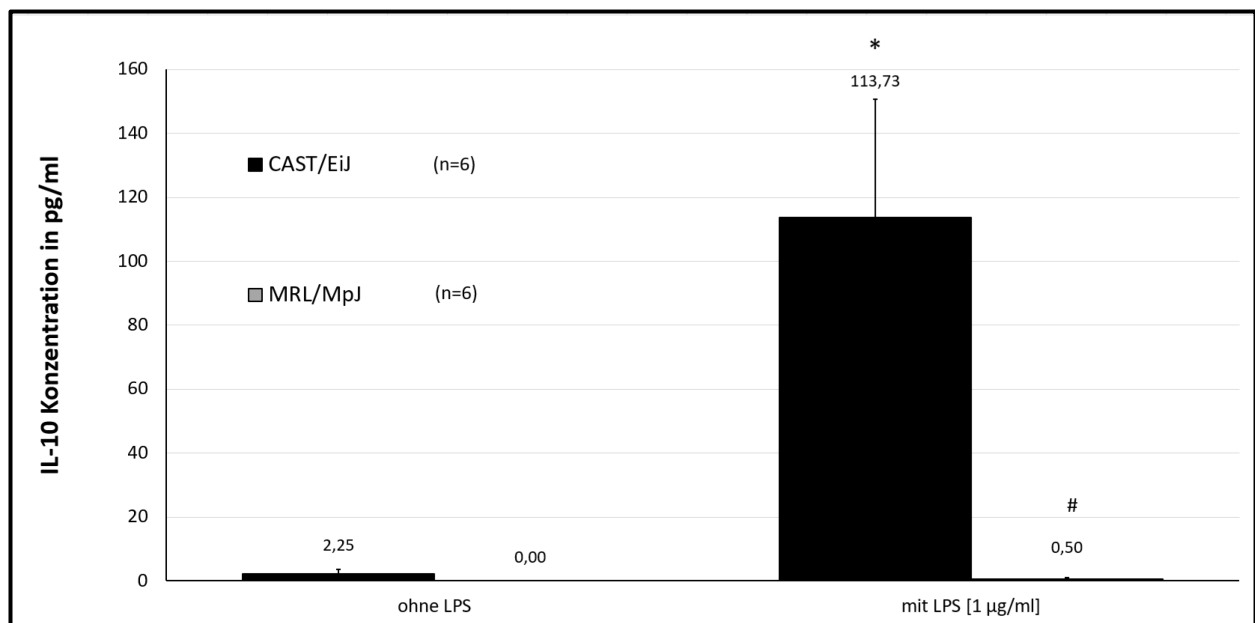


Abbildung 12: LPS-Effekte auf die IL-10-Konzentrationen in cDC-Kulturüberständen. Die am Tag 10 nach der Knochenmarksisolierung und alleinigen Routinekultivierung mit GM-CSF [20 ng/ml] – sowie zum Teil zusätzlicher LPS-Stimulation [1 µg/ml] – gewonnenen Medium-Überstände wurden für diesen Versuch verwendet. Die IL-10-Konzentrationen der Überstände wurden mittels des LEGENDplex™-Assays der Firma Biolegend detektiert und nach anschließender Regression mitgeführter Standardproben mithilfe einer Eichgeraden vermessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ($n \geq 6$) \pm SEM der IL-10-Konzentrationen der Medium-Überstände ohne und mit LPS-Stimulation. * $P < 0,05$ im Vergleich identisch kultivierter cDCs desselben Stammes ohne LPS, # $P < 0,05$ im Vergleich identisch kultivierten cDCs von CAST/EiJ Mäusen.

In Abwesenheit von LPS war IL-10 in den Mediumüberständen von MRL/MpJ-Mäusen überhaupt nicht und in denen von CAST/EiJ-Mäusen nur in minimalen Konzentrationen nachweisbar. Der Unterschied zwischen den beiden Stämmen war keineswegs signifikant.

Nach der Zugabe von LPS kam es bei cDCs aus CAST/EiJ-Mäusen zu einer signifikanten Steigerung der IL-10 Sekretion. Zellen der MRL/MpJ-Mäuse konnten ihre Sekretion dagegen so gut wie gar nicht steigern. Im Ergebnis waren die IL-10-Konzentrationen der CAST/EiJ-Tiere verglichen mit denen von MRL/MpJ-Tieren signifikant stark erhöht.

Die folgende Abbildung 13 zeigt analog den vorangegangenen Abbildungen die in den Medium-Überständen detektierten MCP-1-Konzentrationen. MCP-1 kann als chemotaktisch wirksames Protein die Migration dendritischer Zellen *in vitro* beeinflussen [140].

Dargestellt sind die in den Überständen der Kulturmedien beider cDC-Populationen enthaltenen Mengen des Chemoattractants in Abhängigkeit von der Präsenz des LPS.

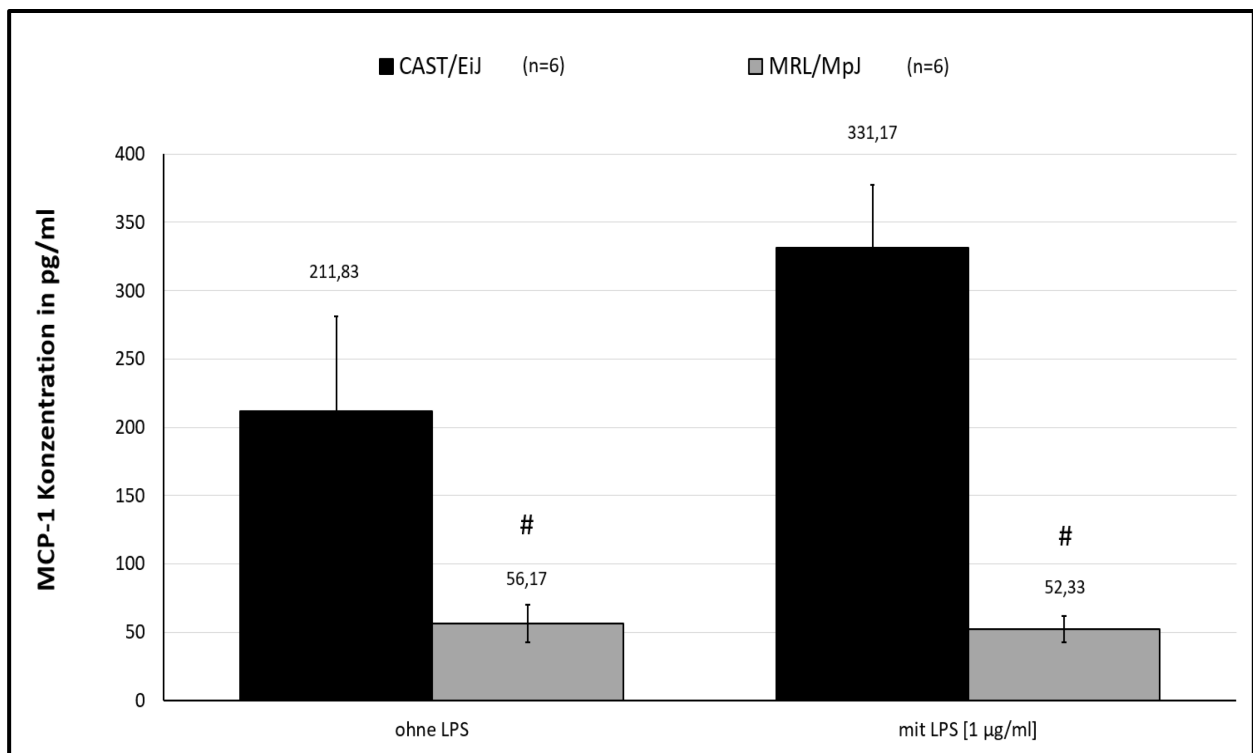


Abbildung 13: LPS-Effekte auf die MCP-1-Konzentrationen in cDC-Kulturüberständen. Die am Tag 10 nach der Knochenmarksisolation und alleinigen Routinekultivierung mit GM-CSF [20 ng/ml] – sowie zum Teil zusätzlicher LPS-Stimulation [1 µg/ml] – gewonnenen Medium-Überstände wurden für diesen Versuch verwendet. Die MCP-1-Konzentrationen der Überstände wurden mittels des LEGENDplex™-Assays der Firma Biolegend detektiert und nach anschließender Regression mitgeführter Standardproben mithilfe einer Eichgeraden vermessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ($n \geq 6$) \pm SEM der MCP-1-Konzentrationen der Medium-Überstände ohne und mit LPS-Stimulation. * $P < 0,05$ im Vergleich identisch kultivierter cDCs desselben Stammes ohne LPS, # $P < 0,05$ im Vergleich identisch kultivierten cDCs von CAST/EiJ Mäusen.

In Abwesenheit von LPS war MCP-1 in den Mediumüberständen von MRL/MpJ-Mäusen als auch von CAST/EiJ-Mäusen nachweisbar. Dabei lag die Sekretion der cDCs von CAST/EiJ-Mäusen signifikant über der von MRL/MpJ-Tieren.

Nach der Zugabe von LPS kam es bei cDCs aus CAST/EiJ-Mäusen zu einer Steigerung der MCP-1 Sekretion, wenn auch ohne signifikante Unterschiede zu den LPS-freien Proben. Zellen der MRL/MpJ-Mäuse konnten ihre Sekretion dagegen nicht steigern und fielen im Mittel sogar tendenziell leicht ab, was den signifikanten Unterschied zu Proben von CAST/EiJ-Tieren noch einmal verstärkte.

3.4 qRT-PCR

Ein weiterer Teil der Arbeit bestand darin, die mRNA-Expression ausgewählter Gene in den cDCs der unterschiedlichen Versuchsgruppen zu analysieren. Die Untersuchungen konzentrierten sich dabei vor allem auf solche Gene, die gemäß anderer Untersuchungen der Arbeitsgruppe in einem möglichen Zusammenhang zur Genetik der murinen AIP stehen. Konkret handelte es sich dabei um *Clec4a2*, *Cytip* und *TREM2*, die allesamt inhibierende Wirkungen auf die Dendriten-Funktion ausüben können, sowie *Galnt5* (Einzelheiten und Referenzen s. Kapitel Diskussion).

Die folgende Abbildung 14 zeigt die relativen Mengen der jeweiligen mRNAs in den cDCs der beiden Versuchsgruppen in Abhängigkeit von der Präsenz des LPS.

In Bezug auf die Expression von *Clec4a2* (Abb. 14 A) in den cDCs ließen sich – unabhängig von der Gegenwart bzw. Abwesenheit von LPS – keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Mausstämmen feststellen. Innerhalb der Kohorte von MRL/MpJ-Mäusen fielen jedoch nach der LPS-Stimulation die *Clec4a2* mRNA-Konzentrationen signifikant ab. Dem gleichen Trend folgten auch cDCs von CAST/EiJ-Mäusen, wenngleich hier keine statistische Signifikanz erhoben werden konnte.

Die Expression des *Galnt5*-Gens (Abb. 14 B) war in den cDCs beider Versuchsgruppen sehr gering, wie die sehr niedrigen $2^{-\Delta CT}$ -Werte erkennen lassen. Es fanden sich jedoch Unterschiede zwischen den cDCs der CAST/EiJ-Mäuse einerseits und cDCs aus MRL/MpJ-Mäusen andererseits. Am auffälligsten war dabei das qualitativ unterschiedliche Reaktionsmuster auf die LPS-Stimulation: Während das LPS bei cDCs aus CAST/EiJ-Mäusen einen tendenziellen Abfall der *Galnt5*-Expression bewirkte, kam es bei den cDCs aus MRL/MpJ-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg. Lag die *Galnt5*-Expression in den cDCs aus CAST/EiJ-Mäusen unter LPS-freier Kultivierung noch tendenziell über der des MRL/MpJ-Mausstammes, so zeigten die cDCs aus dem AIP suszeptiblen Stamm eine sogar signifikant höhere Expression.

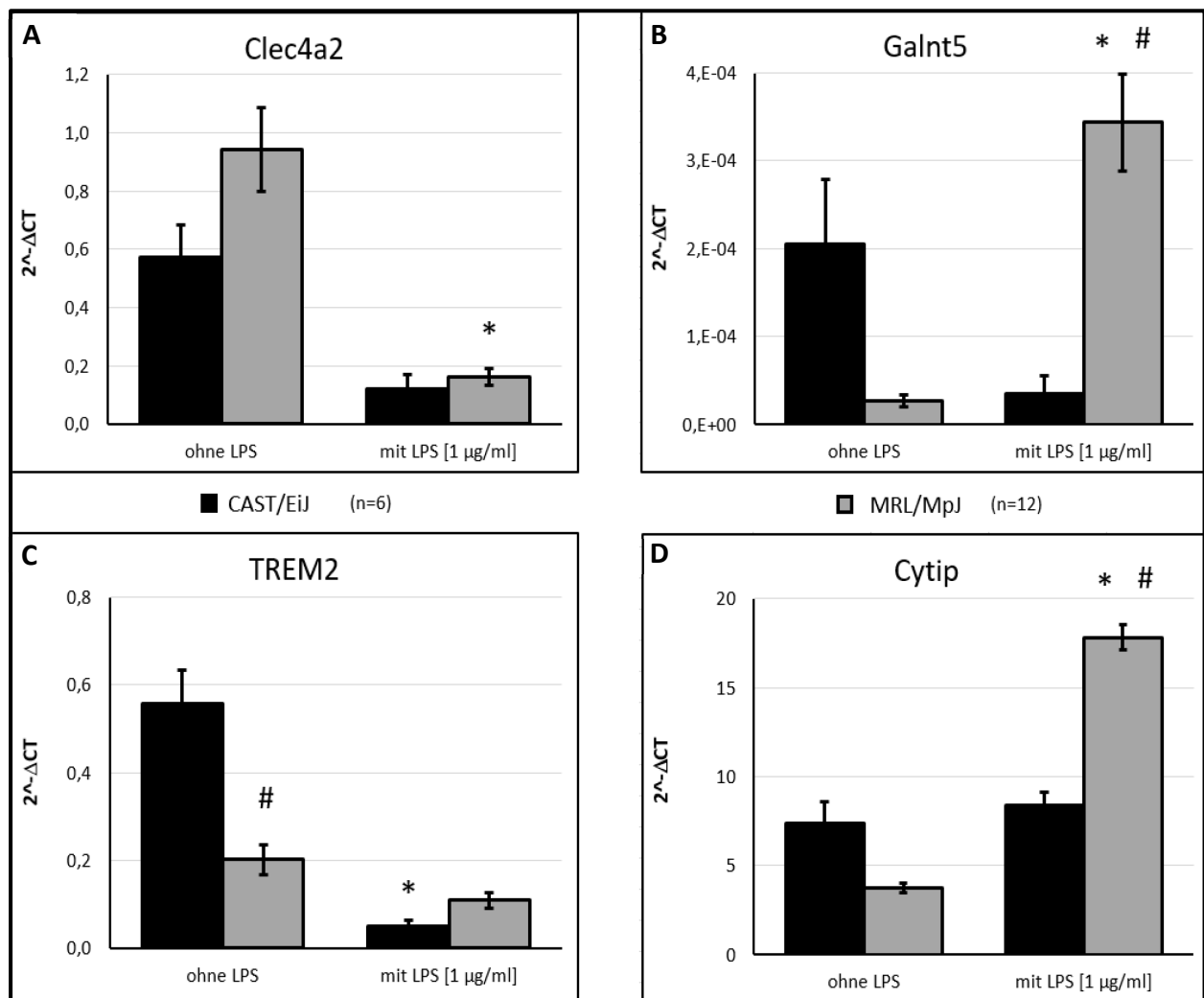


Abbildung 14: Gen-Expressionsprofile *in vitro* generierter cDCs. Für diesen Versuch wurden Zellen an Tag 9 nach der Knochenmarksisolierung verwendet und ohne bzw. mit LPS [1 $\mu\text{g/ml}$] für 24 h in 6-well-Platten (Zellzahl: $3 \times 10^5/\text{ml}$) kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde die RNA mit Trifast® isoliert und im Anschluss mittels der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Real-Time-PCR Analyse für die angegebenen Gene Clec4a2, Galnt5, Cytip, TREM2 und das Housekeeping-Gen HPRT wurde mittels spezifischer „Assays on Demand“ auf einer 96-well-Mikrotiterplatte realisiert. Die Quantifizierung nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen HPRT erfolgte durch die Viia 7 Software. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n \geq 6$) \pm SEM der relativen Mengen der mRNA der jeweiligen Gene mit und ohne LPS-Stimulation. * $P < 0,05$ im Vergleich zu demselben Mausstamm ohne LPS-Stimulation; # $P < 0,05$ im Vergleich zu identisch kultivierten cDCs vom CAST/EiJ Mäusen.

Wie weitere Untersuchungen zeigten, exprimierten cDCs von MRL/MpJ-Mäusen unter LPS-freien Bedingungen signifikant weniger *TREM2*-mRNA als die cDCs von CAST/EiJ-Tieren (Abb. 14 C). Die anschließende Stimulation mit LPS induzierte beim AIP-resistenten CAST/EiJ-Mausstamm einen signifikanten Abfall der *TREM2*-mRNA-Konzentrationen, wenngleich sich ein ähnlicher Trend der cDCs von MRL/MpJ-Mäusen abzeichnete.

Hinsichtlich der *Cytip*-Genexpression (Abb. 14 D) konnten zwischen den Kohorten der nicht stimulierten Kulturen keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden. Nach Stimulation mit LPS hingegen exprimierten die cDCs der MRL/MpJ-Mäuse signifikant mehr *Cytip*-mRNA als Zellen des AIP-resistenten CAST/EiJ-Kontrollstammes und konnten dabei ihre Expression gegenüber den nicht stimulierten Kultur-Ansätzen signifikant steigern.

4 Diskussion

In kürzlich durchgeführten Untersuchungen an AIP-suszeptiblen MRL/MpJ-Mäusen konnte die Arbeitsgruppe des Doktoranden große Zahlen an DCs in Nachbarschaft zu CD3⁺ Zellen innerhalb pankreatischer Gewebsläsionen erkrankter Tiere nachweisen. Diese und weitere Beobachtungen standen damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Arai *et al.* [4]. In den meisten Fällen legten die Studien nahe, dass das Auslösen von Autoimmunität nicht bloß mit der Zu- oder Abnahme der DCs korreliert, sondern vielmehr von der Funktionalität dieser Zellen abhängig ist [35]. Um die Funktionalität und das Verhalten der DCs weiter zu untersuchen und Einblicke in molekulare Abläufe zu gewinnen, wurden in dieser Arbeit *in vitro* Studien mit aus Knochenmarkszellen generierten cDCs der jeweiligen Mausstämme durchgeführt.

4.1 Aus MRL/MpJ-Mäusen *in vitro* generierte cDCs weisen einen reiferen, aktiven Phänotyp auf

Zur näheren Charakterisierung ihrer Funktionszustände wurden die cDCs einer durchflusszytometrischen Detektion der DC-typischen Oberflächenmarker CD40, CD80, CD83, CD86 und MHC-II unterzogen.

Das wohl auffälligste Resultat dabei ist, dass ein Großteil der cDCs von MRL/MpJ-Mäusen mit einer fortgeschrittenen AIP bereits vor einer Stimulation mit LPS einen reifen Phänotyp (CD11c⁺/CD83⁺/MHC-II^{high}/CD40^{high}/CD80^{high}/CD86^{high}) aufweist. Die in dieser Arbeit erhobenen FACS-Daten belegen außerdem, dass mit LPS stimulierte cDC-Kulturen der MRL/MpJ-Mauskohorte einen höheren Anteil gereifter cDCs zeigen, als es bei dem CAST-Kontrollstamm der Fall ist. MRL/MpJ-cDCs befinden sich nicht nur vorab auf einem höheren Aktivitätsniveau, sondern sie zeigten zusätzlich noch die Eigenschaft, nach der LPS-Stimulation im Vergleich zu cDCs der CAST/EiJ-Mauskohorte zu noch größeren Anteilen auszureifen. Zusammen sprechen diese Daten dafür, dass cDCs der MRL/MpJ-Mäuse eine stärkere Ausreifungsfähigkeit besitzen.

Ein spontanes Ausreifen bzw. die spontane Aktivierung von DCs wurde auch in anderen Modellen zur Untersuchung von Autoimmunität beobachtet, was genetisch determinierte Unterschiede und Regulationen vermuten lässt [35, 42]. In die zelluläre Differenzierung während der Ausreifung von DCs sind sowohl die Expression immunstimulatorischer Oberflächenmoleküle – allen voran kostimulatorischer Moleküle für die T-Zell-Aktivierung – als auch das Aufrechterhalten eines

Zytokin-reichen Mikromilieus involviert, was die Chancen erhöht, mit weiteren spezifischen Immunzellen zu interagieren [7].

Speziell die Untersuchungen zur Expression von MHC-II auf CD11c⁺ cDCs stützen diesen Eindruck. MRL/MpJ-cDCs waren schon unter LPS-freien Kulturbedingungen stark positiv für diesen Oberflächenmarker und wiesen in Relation zu den CAST/EiJ-cDCs signifikante Unterschiede auf. MHC-Moleküle spielen eine essenzielle Rolle in der Antigen-Prozessierung und -Präsentation gegenüber Effektorzellen und sind somit an der Initiation zellulärer Reaktionen des adaptiven Immunsystems beteiligt. Speziell MHC-Moleküle der Klasse II präsentieren vorwiegend extrazelluläre Peptide und potenzielle Antigenstrukturen, die durch vorherige rezeptorvermittelte Endozytose als „Bruchstücke“ erneut auf der Zelloberfläche der Dendriten exprimiert und von CD4⁺ Zellen erkannt werden können. Gleichzeitig können quantitative Unterschiede bzgl. des Oberflächenbesatzes dieses Moleküls Aufschluss über den Aktivierungsstatus der DCs geben. Eine intrazelluläre Retention von MHC-II-Molekülen bei unreifen DCs via einer Ubiquitinierung durch das *Membrane Associated Ring-CH-Type Finger 1* (MARCH1) Protein wurde bereits als Besonderheit der DC-Biologie beschrieben [42]. Bei der Aktivierung und Reifung von DCs sistiert in Analogie dazu der Ubiquitinierungsprozess und MHC-II-Moleküle akkumulieren auf der Zelloberfläche [129]. Außerdem weisen *in vitro* generierte cDCs MARCH1-defizienter Mäuse einen großen Anteil MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche auf und können als stark ausgereift angesehen werden [42, 90]. Der bis *dato* beschriebene Zusammenhang zwischen den intrazellulär zurückgehaltenen MHC-II-Molekülen und den daraus resultierenden DC-Funktionen kann durch die positive Wirkung der MHC-II-Dimere selbst auf die Transduktion von *toll like receptor* (TLR)-Signalen erklärt werden [73]. Der Mechanismus, wie MHC-Moleküle TLR-Signale beeinflussen, beinhaltet die Assoziation von intrazellulären MHC-II-Molekülen selbst mit der *Bruton's tyrosin kinase* (Btk). Diese wird während einer TLR-Stimulation phosphoryliert, bindet *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) und *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β* (TRIF) und verstärkt somit die TLR-Transduktion [73].

Interessanterweise vermittelt auch das in den Experimenten dieser Arbeit eingesetzte LPS als *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) seine Wirkungen als Rezeptoragonist via TLR4 [143]. Es beeinflusst bei den cDCs möglicherweise auf eine ähnliche Art und Weise das TLR-Signaling, den MHC-II-Oberflächenmolekülbesatz sowie damit den Reifungsprozess. Speziell der MHC-II-Oberflächenmolekülbesatz auf cDCs von MRL/MpJ-Mäusen könnte demnach durch ähnliche Signalwege und Feedback-Mechanismen reguliert sein. Es müsste auch bei der Zellbiologie dieser cDCs AIP-erkrankter Tiere an molekulare Besonderheiten des MARCH1- bzw.

MHC-II/Btk-Signalings gedacht werden, auch wenn diese in dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

cDCs von MRL/MpJ-Mäusen sind trotz ihres höheren Grundaktivitätsniveaus weiterhin responsiv gegenüber LPS. Auch in anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von LPS in seiner Funktion als PAMP Veränderungen im Membranrezeptor-Besatz (allen voran auch von MHC-II) bei einer Vielzahl von APZs induzieren kann ^[139]. Diese Veränderungen im Membranrezeptorbesatz könnten sich wohl genetisch als auch epigenetisch manifestiert und auf weitere Töchtergenerationen übertragen haben.

Zur Betrachtung ihrer Funktionszustände und ihres Wachstums, wurden die Zellen einem 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU)-Assay unterzogen und mit verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen von GM-CSF-Wachstumsfaktor sowie LPS stimuliert. In der Gesamtschau der Daten lassen sich ähnliche Tendenzen beider Mausstämme herausarbeiten: Unter der Stimulation mit GM-CSF vermögen beide cDC-Kohorten stärker zu proliferieren, wohingegen die Präsenz von LPS die Proliferation zu hemmen vermag. Lediglich die Intensitäten und die Ausprägung dieser Reaktionen unterscheiden die beiden Zell-Kohorten voneinander.

DCs sind als potente APZs ein fundamentales Bindeglied zwischen humoralen und zellulären Immunantworten. Bei einer Stimulation durch potenzielle Pathogene/Antigene durchlaufen die Zellen maßgebliche Veränderungen in ihrem Motilitäts- und immunstimulatorischen Verhalten sowie in ihrem Aktivitätsniveau ^[72, 115]. Überträgt und deutet man die LPS-Stimulation *in vitro* als mögliches inflammatorisches Geschehen *in vivo*, könnte dies als Ausdruck für eine Sensitivierung der cDCs gegenüber potenziellen Pathogenen bei Antigenkontakt gewertet werden. Die Tatsache, dass bereits geringste Konzentrationen von LPS wirksam sind, unterstützt diese Vermutung.

Wie bereits erwähnt, fällt bei den in dieser Arbeit erhobenen Daten auf, dass cDCs der (erkrankten) MRL/MpJ-Mauskohorte auch ohne LPS-Zugabe nicht die Proliferationsraten der cDCs von (gesunden) CAST/EiJ-Kontrollmäusen erreichen. Zugleich ist LPS nicht in der Lage, die Proliferationsraten der MRL/MpJ-cDCs so stark zu senken, wie es bei cDCs der CAST/EiJ-Mäuse der Fall ist. cDCs erkrankter Tiere scheinen demnach weniger sensitiv gegenüber den LPS- und GM-CSF-Wirkungen und somit einem möglichen entzündlichen Geschehen zu sein. Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass Unterschiede (*in puncto* Signaltransduktion via Oberflächenrezeptoren bzw. Rezeptorexpression) bei der Aktivierung von cDCs der MRL/MpJ-Mauskohorte bestehen oder die Zellen von vornherein ein anderes Aktivitätsniveau und andere Funktionszustände aufweisen.

Der BrdU-Assay kann nur einen indirekten Anhalt für die Proliferationsraten der cDCs liefern und für sich allein keinen ausreichenden Aufschluss über das Aktivitätsniveau und den Zustand der

Zellen geben. Zusammen mit den Ergebnissen der flusszytometrischen Untersuchungen zum Oberflächenmolekülbesatz der cDCs konnte das Bild der cDC-Funktionen und des Verhaltens dieser Zellen in der experimentellen AIP erweitert werden. Aktivierte cDCs AIP-erkrankter Tiere sind wohlmöglich deshalb weniger sensitiv gegenüber einer Stimulation durch LPS und GM-CSF, weil sie bereits unstimuliert einen gereiften und immunkompetenteren Phänotyp aufweisen, als es bei cDCs von Kontrolltieren der Fall ist.

4.2 Zytokin- und Chemokin-Expressionsprofile aktivierter cDCs

Wie bereits zuvor erwähnt, kann das Vorhandensein und das Aufrechterhalten eines Zytokinreichen Mikromilieus die DC-Physiologie, die Ausreifung und das Verhalten dieser Zellen maßgeblich beeinflussen ^[7]. Mit den bereits erworbenen Erkenntnissen aus den Analysen der FACS- und Proliferationsassay-Daten kann weiter diskutiert werden, ob nicht auch die aus den Knochenmarkszellen *in vitro* generierten cDCs selbst Anteil an der Zusammensetzung des Mikromilieus haben. Die Zellen könnten somit via para- und autokriner Regelkreise selbst Immunzellfunktionen beeinflussen. Diese Reaktionsmuster sind vermutlich sowohl genetisch als auch epigenetisch determiniert, so dass sie sich auch in den hier untersuchten neu *in vitro* generierten Zellen wiederfinden lassen. Daher wurden die Mediumüberstände der cDC-Kulturen hinsichtlich ihres Gehalts an pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen untersucht.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten belegen deutliche Veränderungen und Unterschiede der Interleukin- und Chemokinsekretion der cDCs der einzelnen Mausstämme. MRL/MpJ-cDCs sezernierten unter LPS-freien Kulturbedingungen signifikant weniger IL-12 und MCP-1, als es bei cDCs des Kontrollstammes der Fall war. Nach einer Stimulation mit LPS steigerten die Zellen lediglich ihre IL-12-Sekretion, wobei sie jederzeit signifikant unter den jeweiligen Konzentrationen der Kontrollstamm-cDCs lagen. Bezüglich des IL-10 konnte bei den MRL/MpJ-cDCs zu keinem der Zeitpunkte (mit oder ohne LPS) eine Sekretion des anti-inflammatorisch wirksamen Interleukins beobachtet werden.

IL-12 wird klassisch den pro-inflammatorischen Zytokinen zugeordnet und maßgeblich von APZs sowie speziell DCs sezerniert. Bereits in anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass aus Knochenmarkszellen isolierte DCs IL-12-abhängig die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems zur Stimulation von INF- γ anregen und so unspezifische Immunreaktionen induzieren können ^[82]. Unter LPS-Stimulation sollten in den Kulturüberständen MRL/MpJ-cDCs eher (signifikant) höhere IL-12-Konzentrationen zu erwarten sein, beobachtet wurde jedoch das

Gegenteil. Die Hintergründe dieses Befundes sollten in Folgeuntersuchungen weitergehend analysiert werden.

IL-10 ist ein immunsupprimierend wirksames Zytokin, das auch die DC-Funktionen mit beeinflussen kann ^[40]. Der IL-10-Rezeptor vermittelt seine Signale durch die Aktivierung des *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3). IL-10 fördert durch eine transkriptionelle Repression inflammatorischer Gene anti-inflammatorische Zustände. Weiterhin supprimiert IL-10 die Expression von MHC-II-Molekülen durch eine gesteigerte Synthese des MARCH1-Proteins ^[120]. Die essenzielle Rolle des IL-10 für anti-inflammatorische Funktionen *in vivo* kann im IL-10-defizienten Mausmodell veranschaulicht werden. Hierbei entwickeln nahezu alle Mäuse spontan entzündliche Darmerkrankungen und andere entzündliche, die Mukosa-Barriere betreffende, Störungen ^[71]. Auch Mäuse mit einer spezifischen Deletion des STAT3-Signalweges entwickeln spontan Kolitiden und mukosale Barrierefunktionsstörungen mit dem Verlust der immunologischen Toleranz ^[80]. Diesbezüglich interessant ist die Tatsache, dass auch IL-6 seine Wirkungen via STAT3 vermittelt, so dass die Grundlagen der Unterschiede zu den Wirkungen von IL-10 noch unklar erscheinen. Die vorrangige Funktion von IL-10 *in vivo* scheint die Suppression der Zytokinproduktion zu sein, wohingegen die IL-6/STAT3-Signalkaskade eher die MHC-II- und CD86-Expression supprimiert ^[42].

Es gibt jedenfalls keinen Anhalt dafür, dass (via LPS) aktivierte cDCs AIP-erkrankter Tiere relevante Mengen IL-10 sezernieren. Zusätzlich dazu veröffentlichte eine Arbeitsgruppe um Mittel *et al.* im November 2015 eine Studie, in der gezeigt werden konnte, dass IL-10-abhängige immunsupprimierende Effekte lediglich durch die Regulation der Antigenexpression durch Makrophagen – nicht aber durch DCs – induziert werden ^[81]. Diese Erkenntnisse gliedern sich damit in die Daten dieser Arbeit ein und stützen die Vermutung, dass cDCs AIP-erkrankter Individuen eher dazu neigen, inflammatorische Funktionszustände zu begünstigen.

Das Vorhandensein von MCP-1 spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen und der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch die Rekrutierung monozytärer Zellen. MCP-1 kontrolliert darüber hinaus auch die Differenzierung von T-Helferzellen in die T_H1- oder T_H2-Subpopulationen ^[11, 23]. In Arbeiten zur Untersuchung des Einflusses von MCP-1 auf die Pathogenese autoimmuner Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition dieses Chemokins und seiner Signalwirkungen die Krankheitsaktivität zu senken vermag ^[11, 65]. Bezogen auf das komplexe Bild der cDC-Funktionen in dieser Arbeit, würde man (zumindest nach einer Stimulation mit LPS) bei cDCs AIP-erkrankter Tiere höhere MCP-1 Konzentrationen als bei cDCs des Kontrollstammes erwarten. Aktivierte und immunkompetente

Dendriten sollten sich durch ihre Fähigkeit zur gezielten und gesteigerten Migration auszeichnen, die indirekt durch MCP-1 mit initiiert wird.

Die erhobenen Daten zeigen jedoch, wie bereits erwähnt, das genaue Gegenteil an. Dieser Fakt unterstützt damit die These und das Bild, dass cDCs AIP-erkrankter Tiere (unabhängig davon, ob aktiviert oder nicht) weniger sensitiv gegenüber den Wirkungen von LPS und einer weiteren Aktivierung sind. Diese Art der „Resistenz“ könnte sich durch veränderte Rezeptorstrukturen oder ein verändertes Rezeptorrepertoire erklären lassen, denn nachweislich weisen diese cDCs einen reiferen, immunkompetenten Phänotyp auf, der synergistisch ein pro-inflammatorisches Zytokin-Milieu fördern und aufrechterhalten sollte.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Mediumüberstände hinsichtlich ihres Zytokin- und Chemokingehalts lassen das Gesamtbild bis hierhin etwas unbalanciert erscheinen. Es gibt viele Anhalte für Unterschiede zwischen den beiden cDC-Kohorten, die jedoch nicht immer für die jeweilige Kohorte im Konsens miteinander stehen.

4.3 Genexpressionsprofile aktivierter cDCs und ihre funktionellen Implikationen

Die bisherigen *in vitro* Untersuchungen konnten bereits Erkenntnisse bezüglich des Oberflächenmolekülbesatzes, des Wachstumsverhaltens und der Wirkung humoraler Faktoren der cDCs erbringen. Für die bisher herausgearbeiteten funktionellen Unterschiede der cDCs der untersuchten Mausstämme erscheinen genetische oder epigenetische Ursachen als wahrscheinlich, vor allem auch, weil die cDCs zunächst *in vitro* generiert wurden und dennoch diese Eigenschaften zeigen.

In einem weiteren Schritt wurde daher auf Transkriptionsebene die Expression der Gene *Clec4a2*, *Galnt5*, *TREM2* und *Cytif* näher untersucht. Untersuchungen der Arbeitsgruppe des Doktoranden zufolge handelt es sich hierbei um potenzielle Risikogene, die für die Entstehung einer AIP mit Funktionen innerhalb der DCs interessant sind [6].

Clec4a2 wird unter anderem auch als *Dendritic Cell Immunoreceptor* (DCIR) bezeichnet und gehört zur Familie der Kohlenhydrat-bindenden Lektine. Sie sind im weiteren Sinne *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) und damit immunologisch wichtige Proteinstrukturen, die ihrer Aufgabe als Zuckersequenz-bindende Antigen-Rezeptoren nachkommen und die Aktivierung immunkompetenter Zellen unterstützen. *Clec4a2* wird hauptsächlich auf DCs exprimiert [121].

Bei der Untersuchung der relativen mRNA-Mengen konnten signifikante Unterschiede in der Expression dieses Gens beobachtet werden. Die *Clec4a2*-mRNA-Expression nimmt bei beiden cDC-Kohorten nach einer LPS-Stimulation ab. Lediglich cDCs der MRL/MpJ-Mauskohorte

weisen jedoch einen signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression nach LPS-Stimulation auf. Dies könnte einen Anhalt dafür bieten, dass aktivierte cDCs AIP-erkrankter Individuen einen mangel- oder fehlerhaften PPR-Besatz aufweisen und so fehlregulierte Immunreaktionen initiieren könnten.

Bezüglich der *Galnt5*-Expression lassen sich allenfalls nur Vermutungen anstellen, da der mRNA-Gehalt bei beiden cDC-Kohorten nur marginal über den Nachweisgrenzen lag und geringste Unterschiede statistisch zu stark ins Gewicht fallen. Die Tendenz zeigt jedoch in Richtung einer höheren Expression dieses Gens in cDCs erkrankter Tiere nach einer Simulation mit LPS, wohingegen die Expression bei cDCs des Kontrollstammes unter diesen Bedingungen eher abfiel. *Galnt5* wird mit der Progression maligner Tumore in Verbindung gebracht und zumindest bei einigen Tumorentitäten als prognostisch relevanter Verlaufsmarker angesehen ^[10]. Inwiefern diese Beobachtungen relevant für die Gesamtbetrachtung der cDC-Funktionen sind, bleibt fraglich.

Hinsichtlich des *TREM2*-Gens zeigte sich, dass die Expression innerhalb LPS freier Kulturen von cDCs erkrankter Mäuse signifikant geringer ist, als es bei cDCs von CAST/EiJ-Mäusen der Fall ist. Nach einer Stimulation mit LPS sinkt die Expression der cDCs des CAST/EiJ-Kontrollstammes signifikant ab. Im Vergleich dazu vermindert sich die Expression auf Seiten der cDCs AIP-erkrankter Tiere nur marginal.

TREM2 wird auf myeloiden Zellen und damit auch auf DCs exprimiert. Es ist ein immunmodulierender Rezeptor mit einer zentralen Rolle für die Aktivierung und das Überleben myeloider Zellen ^[69]. Die Meinungen über die Rolle von *TREM2* bezüglich eines Inflammationsgeschehens gehen – wie bereits in dieser Arbeit beschrieben – weit auseinander. Die Effekte auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine als auch ein *TREM2*-induzierter „enthemmter“ Phänotyp von DCs stehen bei der Diskussion im Mittelpunkt ^[21]. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten lassen den Schluss zu, dass cDCs erkrankter Tiere diesen Rezeptor auf mRNA-Ebene bereits unter physiologischen Bedingungen weitaus weniger exprimieren, als es bei cDCs des CAST/EiJ-Kontrollstammes bzw. gesunder Tiere der Fall ist. Vollständig (via LPS) aktivierte cDCs des AIP-suszeptiblen Mausstammes zeigen eine nur tendenziell geringere Expression von *TREM2*, wohingegen es bei cDCs des Kontrollstammes zu einem signifikanten Abfall der Expression dieses Rezeptors kommt. Erneut kann die Annahme von weniger sensitiven cDCs AIP-erkrankter Tiere gegenüber den Wirkungen von LPS gestellt werden. Dies korreliert mit dem Bild bereits (vor)aktivierter cDCs, die einen reifen, immunkompetenteren Phänotyp aufweisen.

Unterstellt man eine eher anti-inflammatorische Wirkung von *TREM2* auf die DC-Funktionen, könnte man diskutieren, dass im Falle von cDCs AIP-suszeptibler Mäuse ein eher höheres

Potenzial bestünde, inflammatorische Immunreaktionen zu initiieren und zu unterhalten. Diese Überlegungen sind jedoch nur hypothetisch. Eine vollständige Interpretation setzt ein besseres Verständnis der Rolle von *TREM2* in der DC-Aktivierung voraus, welches in Folgearbeiten erzielt werden müsste.

Weiterhin wurden die cDCs auch hinsichtlich ihres Gehalts und der Expression von *Cytip*-mRNA untersucht. *Cytip* ist maßgeblich an der Regulation von Funktionen der DCs bei Hypersensitivitätsreaktionen und der Zell-Adhäsion beteiligt. Die Expression dieses Proteins wird während der DC-Reifung und -Differenzierung sowie bei der Aktivierung von T-Zellen induziert. Es konnte gezeigt werden, dass *Cytip* auch direkt in die Regulation von Immunantworten involviert ist. Weiterhin belegen Untersuchungen, dass DCs aus *Cytip*-defizienten Knock-out-Mäusen ein gesteigertes inflammatorisches Reaktionspotenzial aufweisen ^[45]. *Cytip* übt damit wahrscheinlich vielfältige immunregulatorische Funktionen aus, die sich nicht einheitlich als pro- oder anti-inflammatorisch klassifizieren lassen. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten belegen, dass (via LPS) aktivierte cDCs erkrankter MRL/MpJ-Mäuse im Vergleich zu identischen, nicht stimulierten Zellen sowie zu aktivierten CAST/EiJ-cDCs eine signifikant erhöhte mRNA-Expression des *Cytip*-Gens aufweisen. Wie genau sich diese Beobachtungen auf mRNA-Ebene schlussendlich in den Funktionen und der Physiologie dieser Zellen *in vitro* und *in vivo* widerspiegeln, bleibt weiterhin fraglich und müsste in weiteren Folgeuntersuchungen genauer herausgearbeitet werden.

5 Integrative Betrachtung und Ausblick

5.1 MRL/MpJ-cDCs im Kontext der (Auto)Immunität sowie der AIP

In früheren Studien zur Pathogenese humaner und experimenteller Autoimmunerkrankungen (z.B. DMT 1, SLE und Psoriasis) konnten bereits der Einfluss und die Funktion vieler DC-Subtypen näher herausgearbeitet werden ^[35]. Zur Rolle von DCs für die Entstehung einer AIP war jedoch bis vor kurzem noch nichts bekannt. Erst Arai *et al.* konnten ab 2015 mit dem ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten MRL/MpJ-Mausmodell den Beitrag des pDC-Subtyps für die Entstehung und Aufrechterhaltung muriner AIPs genauer herausarbeiten. Sie postulierten, dass zuvor durch *neutrophil extracellular traps* (NETs) stimulierte pDCs die Hauptverantwortlichen der IFN- α -Produktion im Rahmen der murinen AIP sind. Darüber hinaus fanden die Forscher in Pankreasgewebeproben von Patienten mit einer IgG4-vergesellschafteten AIP IFN- α -exprimierende pDCs und zusätzlich signifikant höhere Serum-Spiegel an IFN- α ^[4]. Auch in der 2017 erschienenen weiterführenden Arbeit der Gruppe um Watanabe *et al.* wurden am MRL/MpJ-Mausmodell die Rolle der pDCs als Hauptverantwortliche der IFN- α - sowie IL-33-Produktion und damit der Initiation der Entstehung einer AIP bekräftigt ^[132]. Welche Rolle speziell die Zellen des cDC-Subtyps für die Entstehung und Aufrechterhaltung dieser Erkrankung spielen, ist hingegen auch bis *dato* noch nicht bekannt.

DCs sind als potente APZs maßgeblich an der Initiation, Regulation und Interaktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems beteiligt. Eine dysfunktionale Physiologie sowie eine fehlregulierte Aktivierung dieser Zellen können demnach als mögliche Induktoren einer Reihe von Autoimmunkrankheiten in Frage kommen ^[35]. Besonders die DC-T-Zell-Interaktionen stehen dabei oft im Mittelpunkt immunologischer Betrachtungen und sind Gegenstand zahlreicher Studien zur Ätiologie und Pathogenese autoimmuner Erkrankungen. Eine Interaktion zwischen DCs und T-Zellen entscheidet immer über eine Aktivierung hin zu inflammatorisch aktiven Funktionszuständen oder der Induktion tolerogener Effekte. T-Zellen haben hierfür effiziente Mechanismen entwickelt, um suffizient auf potenziell gefährliche Antigene durch das Erkennen von auf MHC-Komplexen exprimierten pathogenen Peptidbausteinen (pep-MHCs) zu reagieren. Es ist gut bekannt, dass T-Zellen, die Organismus-eigene pep-MHCs (*self*-pep-MHCs) erkennen und binden, während ihrer Hämatopoese und Ausreifung im Thymus einer aktiven und gezielten negativen Selektion unterliegen ^[13, 86]. Eine periphere Toleranzentwicklung dieser Effektorzellen gegenüber *self*-pep-MHCs zu fördern, um so einer Aktivierung autoreaktiver T-Zell-Populationen

entgegenzuwirken, wird als essenzielle Eigenschaft effizient operierender Immunsysteme erachtet [118]. Hierbei bestimmt der Anteil von auf aktivierten DCs dargebotenen *self*-pep-MHCs maßgeblich die Funktionszustände von T-Zellen. Diese reichen von freibeweglichen, rasch Antigene abtastenden Phänotypen hin zu immunologisch stabilen, DC-T-Zell-interagierenden Varianten [16, 49]. Solche stabilen DC-T-Zell-Interaktionen (> 8 h) stellen die Grundvoraussetzung einer effizienten T-Zell-Differenzierung und sich anschließender zellulärer Immunreaktionen dar [26]. Die T-Zellzahlen sinken in Gegenwart einer gesteigerten *self*-pep-MHC-Expression auf aktivierten DCs dabei rapide. Ein reziproker Effekt der Zellzahl wird physiologischer Weise bei einer geringen *self*-pep-MHC-Expression aktivierter DCs beobachtet [85].

Eine weitere Komponente, die Einfluss auf die Interaktionen und T-Zellzahl nimmt, stellen die bereits in der Einleitung erwähnten $CD4^+CD25^+$ Tregs dar. Tregs inhibieren DC-T-Zell-Interaktionen und senken die T-Zellzahlen. Diese Effekte beruhen nicht auf kompetitiven Antagonismen der Tregs und T-Zellen an exprimierten *self*-pep-MHCs. Sie basieren eher auf direkten Kontakten mit responsiven T-Zellen bzw. indirekt auf den Interaktionen mit DCs [36].

Im Kontext der AIP und den in dieser Arbeit erhobenen Daten zur Rolle, Physiologie und Funktion von MRL/MpJ-cDCs liegt es nahe, auch diese Zellen hinsichtlich relevanter Interaktionen mit Effektorzellen des Immunsystems genauer zu betrachten. Bereits die Studien der Arbeitsgruppe des Doktoranden zu AIP-relevanten Kandidatengen, zu denen auch *Cytip* zählte, stützten diese Überlegungen [6, 12]. *Cytip* scheint mitverantwortlich für ein Sistieren der DC-T-Zell-Interaktion während einer Immunreaktion zu sein [110]. So untersuchte die Gruppe parallel zu dieser Arbeit, welche Effekte cDCs AIP-erkrankter Mäuse *in vitro* auf syngene T-Zellpopulationen ausüben. Die Hypothese, dass Milzen erkrankter Tiere einen höheren Anteil immunologisch vorgereifter T-Zellen enthalten, die einen Einfluss auf die T-Zellproliferation bei DC-Kontakt haben, führte zu *in vitro* Untersuchungen in einem Ko-Kultursystem. Die Daten belegen, dass zuvor mit LPS behandelte sowie unbehandelte cDCs effizient die DNA-Synthese syngener T-Zellen von jungen und älteren MRL/MpJ-Mäusen zu steigern vermögen [14]. Eine MRL/MpJ-cDC-abhängige Proliferation syngener T-Zellen gilt unter Ko-Kultur-Bedingungen somit als wahrscheinlich. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung zu früheren Untersuchungen DC-abhängiger T-Zellproliferationen innerhalb von *in vitro* T-Zell-DC-Ko-Kultursystemen [36].

In jüngsten Folgestudien betrachtete die Arbeitsgruppe einzelne T-Zell-Subpopulationen, die mit der Induktion und Progression einer AIP in Verbindung stehen könnten, genauer. Es wurden unaufgereinigte Splenozyten, $CD3^+$ -T-Zellen, $CD4^+$ -T_Heff-Zellen, $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen sowie $CD4^+CD44^{high}$ -T_{Gedächtnis}-Zellen AIP-erkrankter Tiere in bis dato gesunde – aber dennoch suszeptible – MRL/MpJ-Mäuse transferiert. Die Ergebnisse belegen, dass Splenozyten sowie

CD3⁺-T-Zellen effizient eine AIP induzieren können, während CD4⁺-T_{Helfer}-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen für sich allein genommen dazu nicht befähigt sind. Als besonders effektives Beispiel erwiesen sich CD4⁺CD44^{high}-T_{Gedächtnis}-Zellen, die trotz ihrer geringeren transfundierten Zellzahl mit hoher Effizienz eine AIP in den Empfänger-Tieren auslösten [26]. Die Hypothese, dass Tregs in der Lage sind, die Progression einer spontanen murinen AIP zu inhibieren bzw. zu beeinflussen, konnte hingegen nicht belegt werden.

Die *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeit zu cDCs AIP-erkrankter MRL/MpJ-Mäuse konnten weitere Erkenntnisse zur Rolle der Zellen in der Pathogenese der murinen AIP liefern. MRL/MpJ-cDCs weisen einen (vor)gereiften, aktiven und immunkompetenten Phänotyp auf. Als besonders auffällig erscheint unter physiologischen Bedingungen eine erhöhte Expression von MHC-II auf der Oberfläche der cDCs, was die Zellen als potente APZs ausweisen könnte. In Gegenwart potenziell pathogener Antigenstrukturen zeigen die Zellen zusätzlich die Eigenschaft, zu noch größeren Anteilen auszureifen. Aktivierte cDCs sezernieren vorwiegend pro-inflammatorische Mediatorsubstanzen wie IL-12 und MCP-1, die in direktem Zusammenhang mit humoralen Immunreaktionen stehen. Auf Ebene der Genetik weisen MRL/MpJ-cDCs Auffälligkeiten bezüglich der Expression AIP-relevanter Kandidatengene auf, die sich zusammenfassend nicht einheitlich als pro- oder anti-inflammatorisch einordnen lassen. Einige dieser Gene stehen, wie bereits erwähnt, in Zusammenhang mit der DC-T-Zell-Interaktion. Dies kann zusätzlich auf Einflüsse der cDCs auf zelluläre Immunreaktionen hinweisen.

In der Gesamtbetrachtung weisen cDCs AIP-erkrankter Tiere eine Vielzahl funktioneller Auffälligkeiten auf, die die Zellen hinsichtlich ihrer pathophysiologischen Rolle von ebenfalls mit der Pathogenese einer AIP in Verbindung gebrachten pDCs unterscheiden. cDCs AIP-erkrankter Tiere sind potenziell in die Initiation und Stabilisierung von zellulären Immunreaktionen involviert. Ihr unter physiologischen Bedingungen (vor)gereifter Phänotyp und das Mikromilieu befähigen die Zellen möglicherweise zu unphysiologisch gesteigerten Antigen-Präsentationen und Interaktionen mit CD4⁺ T-Zellen, die wiederum zu hohen Anteilen hin zu T-Effektorzellen differenzieren können. Die folgende Abbildung 15 veranschaulicht eine hypothetische Betrachtung der potenziellen Rolle von MRL/MpJ-cDCs in der Pathogenese der murinen AIP (s. f. S. Abb. 15).

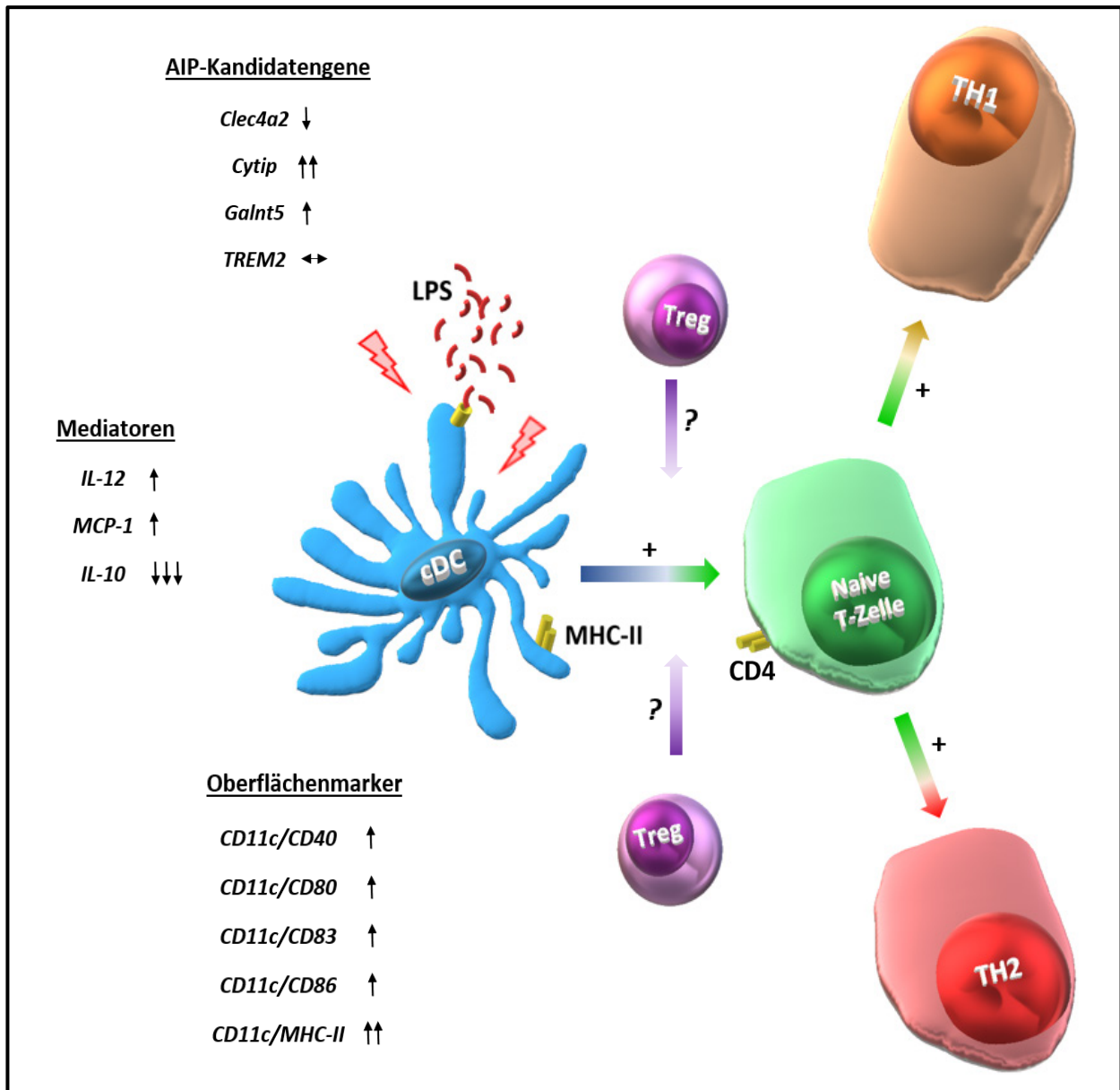


Abbildung 15: Hypothetische Betrachtung der potenziellen Rolle von MRL/MpJ-cDCs in der Pathogenese der murinen AIP. MRL/MpJ-cDCs weisen schon unter physiologischen Bedingungen einen aktiven, (vor)gereiften und immunologisch wirksamen Phänotyp auf. Die Zellen besitzen zusätzlich die Fähigkeit, zu noch größeren Anteilen auszureifen. (Via LPS) Aktivierte cDCs sind positiv für die DC-typischen Oberflächenmarker CD40, CD80, CD83, CD86 und stark positiv für MHC-II. Sie sezernieren vorwiegend pro-inflammatorische Mediatorsubstanzen wie IL-12 und MCP-1, jedoch nur sehr wenig anti-inflammatorisch wirksames IL-10. In der Folge entsteht ein eher pro-inflammatorisches Mikromilieu. cDCs AIP-erkrankter Mäuse zeigen zusätzlich Auffälligkeiten hinsichtlich der Expression AIP-relevanter Gene (wie *Clec4a2*, *Cytip*, *Galnt5*, *TREM2*), die auf vielfältige immunregulatorische Funktionen der Zellen hinweisen. Konkret zeigen sich relevante Unterschiede in der *Clec4a2*- und *Cytip*-Expression. Speziell *Cytip* scheint in die Interaktion von DCs mit T-Zellen involviert zu sein. Der unter physiologischen Bedingungen (vor)gereifte Phänotyp und das Mikromilieu befähigen die MRL/MpJ-cDCs möglicherweise zu unphysiologisch gesteigerten Antigen-Präsentationen und Interaktionen mit CD4⁺ T-Zellen, die wiederum zu hohen Anteilen hin zu T-Effektorzellen (T_H1, T_H2) differenzieren können. Inwiefern zusätzlich Tregs die DC-T-Zell-Interaktionen beeinflussen und somit tolerogene Effekte induzieren, bleibt weiterhin fraglich.

5.2 Ausblick

Das MRL/MpJ-Mausmodell ist für *in vitro* Untersuchungen zur Pathogenese der murinen AIP geeignet. Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen zur Rolle und Funktion von cDCs könnten deshalb langfristig neue Therapieansätze oder diagnostische Verfahren für die Klinik erwachsen. Zu beachten sind dabei jedoch auch die Grenzen eines Tiermodells. Ein Übertragen der Erkenntnisse aus dem Mausmodell *in vitro* auf eine Situation beim Patienten *in vivo* ist natürlich nicht unmittelbar möglich. *In vivo* Studien zur Rolle von DCs in der Pathogenese der AIP sollten sich daher in Zukunft anschließen.

Weiterhin könnten Folgestudien bzgl. des Proliferationsverhaltens, der Rezeptor-Expression und der Expression humoraler Faktoren an direkt aus dem Blut von AIP-Patienten gewonnenen cDCs realisiert werden. Ziele wären, die Charakteristika dieser humanen Zellen in der *in vivo* Situation abzubilden und die Erkenntnisse der *in vitro* Studien zu erweitern und zu bewerten. Ebenso kann versucht werden, die cDCs im Mausmodell *in vivo* zu depletieren, um weitere Informationen zu DC-Funktionen im Kontext der AIP zu gewinnen. Auch Studien am Mausmodell mit gezielten *Knock-outs* AIP- und DC-relevanter Gene sind denkbar, ebenso wie die Gabe und Testung immunmodulierender (z.B. die DC-T-Zell-Interaktion inhibierender) Biologika.

6 Zusammenfassung

Die AIP stellt als eigene Entität chronischer Pankreatitiden eine heterogene Erkrankung multifaktorieller Genese dar. Eine Charakterisierung und Diagnosestellung ist schwierig, kann aber anhand der seit 2006 entwickelten HISORT- und ICDC-Kriterien erfolgen. Basierend auf neueren histologischen und pathogenetischen Untersuchungen wird die AIP in 2 Subtypen unterteilt. Der Subtyp 1 stellt ein Krankheitsbild dar, das als lymphoplasmazytäre sklerosierende Pankreatitis (LPSP) bezeichnet wird. Der Subtyp 2 wiederum wird als idiopathische dukt-zentrische Pankreatitis (IDCP) definiert. Beiden Formen ist eine Infiltration des Pankreas und umliegender Strukturen mit immunkompetenten Zellen gemeinsam.

Die Ätiologie und die Pathogenese der Erkrankung wurden bis heute nur unzureichend verstanden. Der Beitrag sowohl zellulärer als auch humoraler Immunreaktionen zur Autoimmunität gilt dabei jedoch als wahrscheinlich. Das aktuelle Konzept der AIP nach Okazaki *et al.* sieht ein biphasisches Model der „Induktion“ und Progression“ der Erkrankung vor. Die initiale Immunantwort gegenüber Selbstantigenen könnte durch eine verminderte Anzahl naiver Tregs bedingt sein („Induktion“). Die nachfolgende T_H2-Zell-typische Immunantwort mit der Unterstützung von B-Zell-Funktionen sowie der Produktion von Immunglobulinen (IgG4) und Autoantikörpern könnte in die Pathogenese und Pathophysiologie der AIP involviert sein und diese unterhalten („Progression“). Eine Beteiligung von Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen (DCs) gilt als wahrscheinlich, wurde bisher jedoch noch wenig untersucht.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, speziell den Beitrag von DCs zur AIP genauer herauszuarbeiten, da aus solchen Studien langfristig neue Therapieansätze und diagnostische Verfahren erwachsen können.

Die AIP kann nur in einem geringen Ausmaß in etablierten Tiermodellen und Experimenten reproduziert werden. Dennoch konnte der MRL/MpJ-Mausstamm als Tiermodell bei der Analyse autoimmuner Erkrankungen überzeugen und erwies sich als nützliches Instrument zur Untersuchung vieler Aspekte der AIP. Die Erkrankung entwickelt sich in diesem Mausmodell spontan und mit einer hohen Inzidenz, vor allem bei älteren weiblichen Tieren. Im Rahmen von *in vitro* Studien wurden in dieser Arbeit DCs aus Knochenmarkszellen von MRL/MpJ-Mäusen generiert. Durch die Zellkultur und die gezielte Zugabe von *Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor* (GM-CSF) wurden speziell konventionelle DCs (cDCs) generiert. Es folgten Untersuchungen an den cDCs zum Proliferationsverhalten, zur Rezeptor-Expression und Expression humoraler Faktoren mittels flusszytometrischer Analysen, Proliferationsassays (BrdU), *enzyme linked immunosorbent assays* (ELISAs) sowie Echtzeit-PCR-Arbeiten.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen auffällige Besonderheiten der Funktionen und Eigenschaften von cDCs AIP-suszeptibler Tiere, ergeben dabei jedoch kein komplett einheitliches Bild. cDCs erkrankter Tiere weisen bereits ohne Zugabe von Reifungsinduktoren wie Lipopolysaccharid (LPS) einen (vor-)gereiften und potenziell immunkompetenten Phänotyp auf. Sie sind dabei dennoch befähigt, zusätzlich aktiviert zu werden und zu noch höheren Anteilen auszureifen. Dabei vermindern die Zellen ihre Proliferationsraten bei zugleich gesteigerter Expression DC-typischer Oberflächenmarker – vor allem von MHC-II.

Weiterhin zeigen cDCs AIP-suszeptibler Mäuse im Vergleich zu cDCs gesunder Kontrollmäuse Auffälligkeiten und Unterschiede in der Sekretion pro- sowie anti-inflammatorischer Mediatorsubstanzen. Konkret konnten bei aktivierten cDCs signifikante Unterschiede in der Sekretion der pro-inflammatorischen Mediatoren Interleukin-12 (IL-12) und *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) beobachtet werden. Eine Sekretion des anti-inflammatorischen Mediators Interleukin-10 (IL-10) konnte nicht bestätigt werden. In der Konsequenz spielt der Wegfall von IL-10 eine möglicherweise weitaus größere Rolle für die cDC-Funktionen als die geringe Sekretion pro-inflammatorischer Mediatorsubstanzen. Pro-inflammatorische Funktionszustände der Zellen werden somit begünstigt.

Komplettiert wurden die Beobachtungen durch die Untersuchung der Genexpressionsprofile AIP-relevanter Kandidatengene. Konkret zeigen sich auf mRNA-Ebene Unterschiede bei aktivierten cDCs in der Expression des *Dendritic Cell Immunorezeptor* (Clec4a2/DCIR) und des *Cytohesin 1 Interacting Proteins* (Cytip). Diese Veränderungen der mRNA-Expression von cDCs AIP-suszeptibler-Mäuse weisen auf mögliche vielfältige immunregulatorische Funktionen der Zellen hin, die sich abschließend nicht einheitlich als pro- oder anti-inflammatorisch einordnen lassen.

In der Gesamtschau aller Daten ergibt sich ein komplexes Bild der DC-Funktionen und der DC-Biologie im Kontext der murinen AIP. Zunächst einmal zeigen die durchflusszytometrischen Daten deutlich, dass cDCs AIP-erkrankter Tiere eine hohe spontane Ausreifungstendenz mit einer zusätzlich starken Induzierbarkeit aufweisen. Die bis *dato* untersuchten Mediatoren und Gene können diesen Befund jedoch noch nicht hinreichend stützen und erklären. Eine Beteiligung von cDCs an der Aktivierung und Proliferation von T-Effektorzellen gilt dennoch als wahrscheinlich. T-Zellen und besonders ihr CD4⁺CD44^{high}-T_{Gedächtnis}-Subtyp sind in der Lage, im murinen Modell eine AIP auszulösen.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zu cDCs AIP-erkrankter MRL/MpJ-Mäuse konnten weitere Erkenntnisse zur Rolle der Zellen in der Pathogenese der murinen AIP liefern. Besonders die molekularen Mechanismen der DC-Aktivierung und der Immunzell-Interaktionen im Kontext der AIP bedürfen jedoch weiterer aussagekräftiger Folgestudien.

7 Thesen

1. Adulte MRL/MpJ-Mäuse entwickeln spontan eine AIP, die dem humanen Typ-1 ähnelt.
2. Das MRL/MpJ-Mausmodell eignet sich zur Untersuchung und Charakterisierung der Rolle konventioneller dendritischer Zellen (cDCs) in der Pathogenese autoimmuner Pankreatitiden.
3. Aus dem Knochenmark generierte cDCs von MRL/MpJ-Mäusen weisen physiologisch einen (vor-)gereiften, aktiven und immunologisch wirksamen Phänotyp auf.
4. Das Wachstum und die Proliferation der MRL/MpJ-cDCs hängen von der Präsenz des *Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor* (GM-CSF) und von Lipopolysaccharid (LPS) ab.
5. In Gegenwart von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), wie LPS, zeigen MRL/MpJ-cDCs die Eigenschaft, zu noch größeren Anteilen auszureifen.
6. MRL/MpJ-cDCs sezernieren vorwiegend pro-inflammatorische Mediatorsubstanzen, die in direktem Zusammenhang mit humoralen Immunreaktionen stehen.
7. cDCs von MRL/MpJ-Mäusen sezernieren sehr wenig Interleukin 10. In der Folge entsteht ein pro-inflammatorisches Mikromilieu.
8. Das Zytokin- und Chemokin-Sekretionsprofil von MRL/MpJ-cDCs erscheint unbalanciert.
9. MRL/MpJ-cDCs weisen Auffälligkeiten bezüglich der Expression AIP-relevanter Kandidatengene auf.
10. Einige der in MRL/MpJ-cDCs nachgewiesenen Kandidatengene, wie *Cytip* und *TREM2*, stehen in direktem Zusammenhang mit der DC-T-Zell-Interaktion und immunregulatorischen Zellfunktionen.
11. MRL/MpJ-cDCs unterscheiden sich hinsichtlich ihrer pathophysiologischen Rolle von ebenfalls mit der Pathogenese einer AIP in Verbindung gebrachten plasmazytoiden DCs (pDCs).

Literaturverzeichnis

- [1] Abdul-Wahid A, Cydzik M, Prodeus A, Alwash M, Stanojcic M, Thompson M, Huang EH, Shively JE, Gray-Owen SD, Gariépy J. Induction of antigen-specific TH 9 immunity accompanied by mast cell activation blocks tumor cell engraftment. *Int J Cancer*. 2016 Aug 15;139(4):841-53.
- [2] Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*. 2002 Sep;8(9):1024-32.
- [3] Aparisi L, Farre A, Gomez-Cambronero L, Martinez J, De Las Heras G, Corts J, Navarro S, Mora J, Lopez-Hoyos M, Sabater L, Ferrandez A, Bautista D, Perez-Mateo M, Mery S, Sastre J. Antibodies to carbonic anhydrase and IgG4 levels in idiopathic chronic pancreatitis: relevance for diagnosis of autoimmune pancreatitis. *Gut*. 2005;54:703–9.
- [4] Arai Y, Yamashita K, Kuriyama K, Shiokawa M, Kodama Y, Sakurai T, Mizugishi K, Uchida K, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Kudo M, Okazaki K, Strober W, Chiba T, Watanabe T. Plasmacytoid Dendritic Cell Activation and IFN- α Production Are Prominent Features of Murine Autoimmune Pancreatitis and Human IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis. *J Immunol*. 2015 Oct 1;195(7):3033-44.
- [5] Asada M, Nishio A, Uchida K, Kido M, Ueno S, Uza N, Kiriya K, Inoue S, Kitamura H, Ohashi S, Tamaki H, Fukui T, Matsuura M, Kawasaki K, Nishi T, Watanabe N, Nakase H, Chiba T, Okazaki K. Identification of a novel autoantibody against pancreatic secretory trypsin inhibitor in patients with autoimmune pancreatitis. *Pancreas*. 2006 Jul;33(1):20-6.
- [6] Asghari F, Fitzner B, Holzhüter SA, Nizze H, de Castro Marques A, Müller S, Möller S, Ibrahim SM, Jaster R. Identification of quantitative trait loci for murine autoimmune pancreatitis. *J Med Genet*. 2011 Aug;48(8):557-62.

- [7] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.
- [8] Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, Tsiotos GG, Vege SS; Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut.* 2013 Jan;62(1):102-11.
- [9] Beck LH Jr., Salant DJ. Membranous nephropathy: recent travels and new roads ahead. *Kidney Int.* 2010;77:765–70.
- [10] Berois N, Gattolliat CH, Barrios E, Capandeguy L, Douc-Rasy S, Valteau-Couanet D, Bénard J, Osinaga E. GALNT9 gene expression is a prognostic marker in neuroblastoma patients. *Clin Chem.* 2013 Jan;59(1):225-33.
- [11] Bianconi V, Sahebkar A, Atkin SL, Pirro M. The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Curr Opin Hematol.* 2018 Jan;25(1):44-51.
- [12] Bischof J, Müller S, Borufka L, Asghari F, Möller S, Holzhüter SA, Nizze H, Ibrahim SM, Jaster R. Quantitative Trait Locus Analysis Implicates CD4⁺/CD44^{high} Memory T Cells in the Pathogenesis of Murine Autoimmune Pancreatitis. *PLoS One.* 2015 Sep 1;10(9):e0136298.
- [13] Bonasio R, Scimone ML, Schaerli P, Grabie N, Lichtman AH, von Andrian UH. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol.* 2006 Oct;7(10):1092-100.
- [14] Borufka L, Volmer E, Müller S, Engelmann R, Nizze H, Ibrahim S, Jaster R. In vitro studies implicate an imbalanced activation of dendritic cells in the pathogenesis of murine autoimmune pancreatitis. *Oncotarget.* 2016 Jul 12;7(28):42963-42977.
- [15] Böhm I. Flow cytometric analysis of the LE cell phenomenon. *Autoimmunity.* 2004 Feb;37(1):37-44.

- [16] Cahalan MD, Parker I. Imaging the choreography of lymphocyte trafficking and the immune response. *Curr Opin Immunol*. 2006 Aug;18(4):476-82.
- [17] Chang MC, Jan IS, Liang PC, Jeng YM, Yang CY, Tien YW, Wong JM, Chang YT. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene variants are associated with autoimmune pancreatitis and slow response to steroid treatment. *J Cyst Fibros*. 2015 Sep;14(5):661-7.
- [18] Chari ST, Smyrk TC, Levy MJ, Topazian MD, Takahashi N, Zhang L, Clain JE, Pearson RK, Petersen BT, Vege SS, Farnell MB. Diagnosis of autoimmune pancreatitis: the Mayo Clinic experience. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:1010-16; quiz 934.
- [19] Choi Y, Simon-Stoos K, Puck JM. Hypo-active variant of IL-2 and associated decreased T cell activation contribute to impaired apoptosis in autoimmune prone MRL mice. *Eur J Immunol*. 2002 Mar;32(3):677-85.
- [20] Comfort MW, Steinberg AG. Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology*. 1952 May;21(1):54-63.
- [21] Correale C, Genua M, Vetrano S, Mazzini E, Martinoli C, Spinelli A, Arena V, Peyrin-Biroulet L, Caprioli F, Passini N, Panina-Bordignon P, Repici A, Malesci A, Rutella S, Rescigno M, Danese S. Bacterial sensor triggering receptor expressed on myeloid cells-2 regulates the mucosal inflammatory response. *Gastroenterology*. 2013 Feb;144(2):346-356.e3.
- [22] Córbi AL, Lopéz-Rodríguez C. CD11c integrin gene promoter activity during myeloid differentiation. *Leuk Lymphoma*. 1997 May;25(5-6):415-25.
- [23] Daly C, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation* 2003; 10:247-257.

- [24] Debiec H, Lefeu F, Kemper MJ, Niaudet P, Deschênes G, Remuzzi G, Ulinski T, Ronco P. Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin. *N Engl J Med.* 2011;364:2101-10.
- [25] Duell EJ. Epidemiology and potential mechanisms of tobacco smoking and heavy alcohol consumption in pancreatic cancer. *Mol Carcinog* 2012;51(1): 40-52
- [26] Ehlers L, Rohde S, Ibrahim S, Jaster R. Adoptive transfer of CD3⁺ T cells and CD4⁺ CD44^{high} memory T cells induces autoimmune pancreatitis in MRL/MpJ mice. *J Cell Mol Med.* 2018 Jan 31.
- [27] Erkan M, Adler G, Apte MV, Bachem MG, Buchholz M, Detlefsen S, Esposito I, Friess H, Gress TM, Habisch HJ, Hwang RF, Jaster R, Kleeff J, Klöppel G, Kordes C, Logsdon CD, Masamune A, Michalski CW, Oh J, Phillips PA, Pinzani M, Reiser-Erkan C, Tsukamoto H, Wilson J. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut.* 2012;61(2):172-87
- [28] Fitzner B, Holzhueter SA, Ibrahim S, Nizze H, Jaster R. Interferon-gamma treatment accelerates and aggravates autoimmune pancreatitis in the MRL/Mp-mouse. *Pancreatology.* 2009;9(3):233-9.
- [29] Ford JW, McVicar DW. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr Opin Immunol.* 2009 Feb;21(1):38-46.
- [30] Frulloni L, Lunardi C, Simone R, Dolcino M, Scattolini C, Falconi M, Puccetti A. Identification of a Novel Antibody Associated with Autoimmune Pancreatitis. *N Engl J Med.* 2009 Nov 26;361(22):2135-42.
- [31] Fujikado N, Saijo S, Yonezawa T, Shimamori K, Ishii A, Sugai S, Kotaki H, Sudo K, Nose M, Iwakura Y. Dcir deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells. *Nat Med.* 2008 Feb;14(2):176-80.
- [32] Fulwyler MJ. Electronic separation of biological cells by volume. *Science.* 1965 Nov 12;150(3698):910-1.

- [33] Furutani S, Naruishi N, Hagihara Y, Nagai H. Development of an on-site rapid real-time polymerase chain reaction system and the characterization of suitable DNA polymerases for TaqMan probe technology. *Anal Bioanal Chem.* 2016 Aug;408(20):5641-9.
- [34] Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Current Opinion in Rheumatology.* 2003;vol. 15, no. 4, pp. 430-435.
- [35] Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Aug;13(8): 566-577.
- [36] Ge Q, Palliser D, Eisen HN, Chen J. Homeostatic T cell proliferation in a T cell-dendritic cell coculture system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 5;99(5):2983-8.
- [37] Gonoï W, Akai H, Hagiwara K, Akahane M, Hayashi N, Maeda E, Yoshikawa T, Tada M, Uno K, Ohtsu H, Koike K, Ohtomo K. Pancreas divisum as a predisposing factor for chronic and recurrent idiopathic pancreatitis: initial in vivo survey. *Gut.* 2011 Aug;60(8):1103-8.
- [38] Granot T, Senda T, Carpenter DJ, Matsuoka N, Weiner J, Gordon CL, Miron M, Kumar BV, Griesemer A, Ho SH, Lerner H, Thome JJC, Connors T, Reizis B, Farber DL. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity.* 2017 Mar 21;46(3):504-515. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.019.
- [39] Gregoric P, Sijacki A, Stankovic S, Radenkovic D, Ivancevic N, Karamarkovic A, Popovic N, Karadzic B, Stijak L, Stefanovic B, Milosevic Z, Bajec D. SIRS score on admission and initial concentration of IL-6 as severe acute pancreatitis outcome predictors. *Hepatogastroenterology* 57:349–353.
- [40] Grütz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol.* 2005 Jan;77(1):3-15.

- [41] Williams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* 2014 Aug;14(8):571-8. doi: 10.1038/nri3712. Epub 2014 Jul 18.
- [42] Hammer EG, Ma A. Molecular Control of Steady-State Dendritic Cell Maturation und Immune Homeostasis. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31: 743-791.
- [43] Hart PA, Kamisawa T, Brugge WR, Chung JB, Culver EL, Czako L, Frulloni L, Go VL, Gress TM, Kim MH, Kawa S, Lee KT, Lerch MM, Liao WC, Löhr M, Okazaki K, Ryu JK, Schleinitz N, Shimizu K, Shimosegawa T, Soetikno R, Webster G, Yadav D, Zen Y, Chari ST. Long-term outcomes of autoimmune pancreatitis: a multicentre, international analysis. *Gut.* 2013; 62(12): 1771–1776.
- [44] Hart PA, Zen Y, Chari ST. Recent advances in autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology.* 2015 Jul;149(1):39-51.
- [45] Heib V, Sparber F, Tripp CH, Ortner D, Stoitzner P, Heufler C. Cytip regulates dendritic-cell function in contact hypersensitivity. *Eur J Immunol.* 2012 Mar;42(3):589-97.
- [46] Heidkamp GF, Sander J, Lehmann CHK, Heger L, Eissing N, Baranska A, Lühr JJ, Hoffmann A, Reimer KC, Lux A, Söder S, Hartmann A, Zenk J, Ulas T, McGovern N, Alexiou C, Spriewald B, Mackensen A, Schuler G, Schauf B, Forster A, Repp R, Fasching PA, Purbojo A, Cesnjevar R, Ullrich E, Ginhoux F, Schlitzer A, Nimmerjahn F, Schultze JL, Dudziak D. Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment. *Sci Immunol.* 2016 Dec 16;1(6). pii: eaai7677
- [47] Heilingloh CS, Grosche L, Kummer M, Mühl-Zürbes P, Kamm L, Scherer M, Latzko M, Stamminger T, Steinkasserer A. The Major Immediate-Early Protein IE2 of Human Cytomegalovirus Is Sufficient to Induce Proteasomal Degradation of CD83 on Mature Dendritic Cells. *Front Microbiol.* 2017 Feb 1;8:119.

- [48] Heilingloh CS, Kummer M, Mühl-Zürbes P, Drassner C, Daniel C, Klewer M, Steinkasserer A. L Particles Transmit Viral Proteins from Herpes Simplex Virus 1-Infected Mature Dendritic Cells to Uninfected Bystander Cells, Inducing CD83 Downmodulation. *J Virol.* 2015 Nov;89(21):11046-55.
- [49] Henrickson SE, von Andrian UH. Single-cell dynamics of T-cell priming. *Curr Opin Immunol.* 2007 Jun;19(3):249-58.
- [50] Herold G. und Mitarbeiter. Innere Medizin, 2016. Dr. Gerd Herold, Bernhard-Falk-Str. 25, Köln: 504
- [51] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.
- [52] Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science.* 1993; 260: 547-549.
- [53] Huber W, Schmid RM. Diagnose und Therapie der akuten Pankreatitis. Aktuelle Empfehlungen. *Internist.* 2011;52:823–832
- [54] Ideraabdullah FY, de la Casa-Esperón E, Bell TA, Detwiler DA, Magnuson T, Sapienza C, de Villena FP. Genetic and haplotype diversity among wild-derived mouse inbred strains. *Genome Res.* 2004 Oct;14(10A):1880-7.
- [55] Inaba K, Schuler G, Witmer MD, Valinksy J, Atassi B, Steinman RM. Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. Distinct requirements for stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. *J Exp Med.* 1986 Aug 1;164(2):605-13.
- [56] Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S, Muramatsu S, Hodes RJ, Steinman RM. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med.* 1994 Nov 1;180(5):1849-60.

- [57] Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, Qin FX, Gillet M, Liu YJ. Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity*. 2008 Jun;28(6):870-80.
- [58] Jaster R, Emmrich J. Crucial Role of fibrogenesis in pancreatic diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008, 22(1): 17-29.
- [59] Jeremy MB, John L, Tymoczko L. Stryer Biochemie, 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2007.
- [60] Kamisawa T, Chari ST, Giday SA, Kim MH, Chung JB, Lee KT, Werner J, Bergmann F, Lerch MM, Mayerle J, Pickartz T, Lohr M, Schneider A, Frulloni L, Webster GJ, Reddy DN, Liao WC, Wang HP, Okazaki K, Shimosegawa T, Kloeppel G, Go VL. Clinical profile of autoimmune pancreatitis and its histological subtypes: an international multicenter survey. *Pancreas*. 2011 Aug;40(6):809-14.
- [61] Kamisawa T, Egawa N, Nakajima H. Autoimmune pancreatitis is a systemic autoimmune disease. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:2811–12.
- [62] Kamisawa T, Shimosegawa T, Okazaki K, Nishino T, Watanabe H, Kanno A, Omata M. Standard steroid treatment for autoimmune pancreatitis. *Gut*. 2009 Nov;58(11):1504-7.
- [63] Kanno A, Nishimori I, Masamune A, Kikuta K, Hirota M, Kuriyama S, Tsuji I, Shimosegawa T; Research Committee on Intractable Diseases of Pancreas. Nationwide Epidemiological Survey of Autoimmune Pancreatitis in Japan. *Pancreas*. 2012 Aug;41(6):835-9.
- [64] Kanno H, Nose M, Itoh J, Taniguchi Y, Kyogoku M. Spontaneous development of pancreatitis in the MRL/Mp strain of mice in autoimmune mechanism. *Clin Exp Immunol*. 1992 Jul;89(1):68-73.
- [65] Karpus WJ, Reynolds N, Behanna HA, Van Eldik LJ, Watterson DM. Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by a novel small molecular weight proinflammatory cytokine suppressing drug. *J Neuroimmunol* 2008; 203:73–78.

- [66] Kawa S, Ota M, Yoshizawa K, Horiuchi A, Hamano H, Ochi Y, Nakayama K, Tokutake Y, Katsuyama Y, Saito S, Hasebe O, Kiyosawa K. HLA DRB10405-DQB10401 haplotype is associated with autoimmune pancreatitis in the Japanese population. *Gastroenterology*. 2002 May;122(5):1264-9.
- [67] Kawaguchi K, Koike M, Tsuruta K, Okamoto A, Tabata I, Fujita N. Lymphoplasma cell sclerosing pancreatitis with cholangitis sclerosing pancreatitis with cholangitis: variant of primary sclerosing cholangitis extensively involving pancreas. *Hum. Pathol*. 1991; 22: 387-95.
- [68] Klöppel G, Heitz Ph U. Pankreas, aus Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2. Auflage, 2001, Urban & Fischer, München Jena: 753-766
- [69] Kober DL, Brett TJ. TREM2-Ligand Interactions in Health and Disease. *J Mol Biol*. 2017 Apr 19; pii: S0022-2836(17)30179-1.
- [70] Kusuda T, Uchida K, Miyoshi H, Koyabu M, Satoi S, Takaoka M, Shikata N, Uemura Y, Okazaki K. Involvement of inducible costimulator- and interleukin 10-positive regulatory T cells in the development of IgG4-related autoimmune pancreatitis. *Pancreas*. 2011 Oct;40(7):1120-30.
- [71] Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993 Oct 22;75(2):263-74.
- [72] Liu YJ. Dendritic Cell Subsets and Lineages, and Their Functions in Innate and Adaptive Immunity. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):259-62.
- [73] Liu X, Zhan Z, Li D, Xu L, Ma F, Zhang P, Yao H, Cao X. Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. *Nat Immunol*. 2011 May;12(5):416-24.
- [74] Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rössner S, Koch F, Romani N, Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*. 1999 Feb 1;223(1):77-92.

- [75] Macinga P, Pulkertova A, Bajer L, Maluskova J, Oliverius M, Smejkal M, Heczkova M, Spicak J, Hucl T. Simultaneous occurrence of autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer in patients resected for focal pancreatic mass. *World J Gastroenterol.* 2017 Mar 28;23(12):2185-2193.
- [76] Maisonneuve P, Lowenfels AB, Müllhaupt B, Cavallini G, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L, Frulloni L, Ammann RW. Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. *Gut.* 2005;54:510–514.
- [77] Maisonneuve P, Lowenfels AB, Bueno-de-Mesquita HB, Ghadirian P, Baghurst PA, Zatonski WA, Miller AB, Duell EJ, Boffetta P, Boyle P. Past medical history and pancreatic cancer risk: Results from a multicenter case-control study. *Ann Epidemiol.* 2010 Feb;20(2):92-8.
- [78] Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Levy P, Ruzsniwski P. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut.* 2002;51:849-52.
- [79] Mayerle J, Hoffmeister A, Werner J, Witt H, Lerch MM, Mössner J. Chronic pancreatitis – definition, etiology, investigation and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2013 May;110(22):387-93.
- [80] Melillo JA, Song L, Bhagat G, Blazquez AB, Plumlee CR, Lee C, Berin C, Reizis B, Schindler C. Dendritic cell (DC)-specific targeting reveals Stat3 as a negative regulator of DC function. *J Immunol.* 2010 Mar 1;184(5):2638-45.
- [81] Mittal SK, Cho KJ, Ishido S, Roche PA. Interleukin 10 (IL-10)-mediated Immunosuppression: MARCH-I Induction Regulates Antigen Presentation by Macrophages but not Dendritic Cells. *J Biol Chem.* 2015 Nov 6;290(45):27158-67.
- [82] Mittal D, Vijayan D, Putz EM, Aguilera AR, Markey KA, Straube J, Kazakoff S, Nutt SL, Takeda K, Hill GR, Waddell N, Smyth MJ. Interleukin-12 from CD103+ Batf3-Dependent Dendritic Cells Required for NK-Cell Suppression of Metastasis. *Cancer Immunol Res.* 2017 Dec;5(12):1098-1108.

- [83] Miyazawa M, Takatori H, Shimakami T, Kawaguchi K, Kitamura K, Arai K, Matsuda K, Sanada T, Urabe T, Inamura K, Kagaya T, Mizuno H, Fuchizaki U, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Prognosis of type 1 autoimmune pancreatitis after corticosteroid therapy-induced remission in terms of relapse and diabetes mellitus. *PLoS One*. 2017 Nov 22;12(11):e0188549.
- [84] Miyoshi H, Uchida K, Taniguchi T, Yazumi S, Matsushita M, Takaoka M, Okazaki K. Circulating naïve and CD4+CD25high regulatory T cells in patients with autoimmune pancreatitis. *Pancreas*. 2008 Mar; Vol. 36, Issue 2: 133-140.
- [85] Moalli F, Cupovic J, Thelen F, Halbherr P, Fukui Y, Narumiya S, Ludewig B, Stein JV. Thromboxane A2 acts as tonic immunoregulator by preferential disruption of low-avidity CD4+ T cell-dendritic cell interactions. *J Exp Med*. 2014 Dec 15;211(13):2507-17.
- [86] Morris GP, Allen PM. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat Immunol*. 2012 Jan 19;13(2):121-8.
- [87] Nishimori I, Miyaji E, Morimoto K, Nagao K, Kamada M, Onishi S. Serum antibodies to carbonic anhydrase IV in patients with autoimmune pancreatitis. *Gut*. 2005;54:274–81.
- [88] Nishimori I, Tamakoshi A, Otsuki M. Prevalence of autoimmune pancreatitis in Japan from a nationwide survey in 2002. *J Gastroenterol*. 2007;42(Suppl 18):6–8.
- [89] Notohara K, Burgart LJ, Yadav D, Chari S, Smyrk TC. Idiopathic chronic pancreatitis with periductal lymphoplasmacytic infiltration: clinicopathologic features of 35 cases. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:1119–27.
- [90] Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Mito-Yoshida M, Goto E, Aoki-Kawasumi M, Nakayama M, Ohara O, Ishido S. Cutting edge: requirement of MARCH-I-mediated MHC II ubiquitination for the maintenance of conventional dendritic cells. *J Immunol*. 2009 Dec 1;183(11):6893-7.

- [91] Okazaki K, Uchida K. Autoimmune Pancreatitis: The Past, Present, and Future. *Pancreas*. 2015 Oct;44(7):1006-16.
- [92] Okazaki K, Uchida K, Koyabu M, Miyoshi H, Takaoka M. Recent advances in the concept and diagnosis of autoimmune pancreatitis and IgG4-related disease. *J Gastroenterol*. 2011 Mar;46(3):277-288.
- [93] Okazaki K, Uchida K, Koyabu M, Miyoshi H, Ikeura T, Takaoka M. IgG4 cholangiopathy: current concept, diagnosis, and pathogenesis. *J Hepatol*. 2014 Sep;61(3):690-5.
- [94] Okazaki K, Uchida K, Ohana M, Nakase H, Uose S, Inai M, Matsushima Y, Katamura K, Ohmori K, Chiba T. Autoimmune-related pancreatitis is associated with autoantibodies and a Th1/Th2-type cellular immune response. *Gastroenterology*. 2000 Mar;118(3):573-81.
- [95] Ota M, Ito T, Umemura T, Katsuyama Y, Yoshizawa K, Hamano H, Kawa S. Polymorphism in the KCNA3 gene is associated with susceptibility to autoimmune pancreatitis in the Japanese population. *Dis Markers*. 2011;31(4):223-9.
- [96] Ota M, Umemura T, Kawa S. Immunogenetics of IgG4-Related AIP. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;401:35-44.
- [97] Otani Y, Ichii O, Otsuka-Kanazawa S, Chihara M, Nakamura T, Kon Y. MRL/MpJ-Fas(lpr) mice show abnormalities in ovarian function and morphology with the progression of autoimmune disease. *Autoimmunity*. 2015;48(6):402-11.
- [98] Pearson RK, Longnecker DS, Chari ST, Smyrk TC, Okazaki K, Frulloni L, Cavallini G. Controversies in clinical pancreatology: autoimmune pancreatitis: does it exist? *Pancreas*. 2003;27:1–13.
- [99] Petkov PM, Cassell MA, Sargent EE, Donnelly CJ, Robinson P, Crew V, Asquith S, Haar RV, Wiles MV. Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. *Genomics*. 2004 May;83(5):902-11.

- [100] Pfützner RH, Barmada MM, Brunskill AP, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J, Furey WF, Whitcomb DC. SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2000 Sep;119(3):615-23.
- [101] Pickartz T, Mayerle J, Lerch MM. Autoimmune pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2007 Jun;4(6):314-23.
- [102] Pickartz T, Pickartz H, Lochs H, Ockenga J. Overlap syndrome of autoimmune pancreatitis and cholangitis associated with secondary Sjögren's syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Nov;16(12):1295-9.
- [103] Proietto AI, van Dommelen S, Zhou P, Rizzitelli A, D'Amico A, Steptoe RJ, Naik SH, Lahoud MH, Liu Y, Zheng P, Shortman K, Wu L. Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 16;105(50):19869-74.
- [104] Qu WM, Miyazaki T, Terada M, Okada K, Mori S, Kanno H, Nose M. A novel autoimmune pancreatitis model in MRL mice treated with polyinosinic:polycytidylic acid. *Clin Exp Immunol*. 2002 Jul;129(1):27-34.
- [105] Sah RP, Chari ST. Autoimmune pancreatitis: an update on classification, diagnosis, natural history and management. *Curr Gastroenterol Rep*. 2012;14:95–105.
- [106] Sahin-Tóth M, Tóth M. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Nov 19;278(2):286-9.
- [107] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008 May 30;133(5):775-87.
- [108] Sarles H, Sarles JC, Muratore R, Guien C. Chronic inflammatory sclerosis of the pancreas – an autonomous pancreatic disease? *Am J Dig Dis*. 1961 Jul;6:688-98.
- [109] Schneider A, Löhr JM, Singer MV. Die M-ANNHEIM Klassifikation der chronischen Pankreatitis: Vorstellung eines systematischen Klassifikationssystems zur klinischen und wissenschaftlichen Anwendung. *Z Gastroenterol* 2007;45 - P307.

- [110] Schneider A, Michaely H, Weiss C, Hirth M, Rückert F, Wilhelm TJ, Schönberg S, Marx A, Singer MV, Löhr JM, Ebert MP, Pfützner RH. Prevalence and Incidence of Autoimmune Pancreatitis in the Population Living in the Southwest of Germany. *Digestion*. 2017 Sep 29;96(4):187-198.
- [111] Schwaiger T, van den Brandt C, Fitzner B, Zaatreh S, Kraatz F, Dummer A, Nizze H, Evert M, Bröker BM, Brunner-Weinzierl MC, Wartmann T, Salem T, Lerch MM, Jaster R, Mayerle J. Autoimmune pancreatitis in MRL/Mp mice is a T cell-mediated disease responsive to cyclosporine A and rapamycin treatment. *Gut*. 2014 Mar;63(3):494-505.
- [112] Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L, Kamisawa T, Kawa S, Mino-Kenudson M, Kim MH, Klöppel G, Lerch MM, Löhr M, Notohara K, Okazaki K, Schneider A, Zhang L, International Association of Pancreatology. International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: guidelines of the International Association of Pancreatology. *Pancreas*. 2011;40:352–58.
- [113] Song J, Clagett-Dame M, Peterson RE, Hahn ME, Westler WM, Sicinski RR, DeLuca HF. A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 12;99(23):14694-9.
- [114] Sorg H, Lorch B, Jaster R, Fitzner B, Ibrahim S, Holzhueter SA, Nizze H, Vollmar B. Early rise in inflammation and microcirculatory disorder determine the development of autoimmune pancreatitis in the MRL/Mp-mouse. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*(295). pp. G1274-G1280.
- [115] Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:271-96.
- [116] Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:1-22.
- [117] Stone JH, Zen Y, Deshpande V. IgG4-related disease. *N Engl J Med*. 2012;366:539–51.

- [118] Su LF, Kidd BA, Han A, Kotzin JJ, Davis MM. Virus-specific CD4(+) memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. *Immunity*. 2013 Feb 21;38(2):373-83.
- [119] Suffner J, Hochweller K, Kühnle MC, Li X, Kroczeck RA, Garbi N, Hämmerling GJ. Dendritic cells support homeostatic expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells in Foxp3.LuciDTR mice. *J Immunol*. 2010 Feb 15;184(4):1810-20.
- [120] Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault MC, Huppé G, Tremblay J, Aumont A, Houde M, Bartee E, Brunet A, Gauvreau ME, de Gassart A, Gatti E, Baril M, Cloutier M, Bontron S, Früh K, Lamarre D, Steimle V. Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *Eur J Immunol*. 2008 May;38(5):1225-30.
- [121] Troegeler A, Mercier I, Cougoule C, Pietretti D, Colom A, Duval C, Vu Manh TP, Capilla F, Poincloux R, Pingris K, Nigou J, Rademann J, Dalod M, Verreck FA, Al Saati T, Lugo-Villarino G, Lepenies B, Hudrisier D, Neyrolles O. C-type lectin receptor DCIR modulates immunity to tuberculosis by sustaining type I interferon signaling in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jan 24;114(4):E540-E549.
- [122] Tuennemann J, Mössner J, Beer S. Acute pancreatitis: guideline-based diagnosis and treatment. *Internist (Berl)*. 2014 Sep;55(9):1045-56.
- [123] Uchida K, Kusuda T, Koyabu M, Miyoshi H, Fukata N, Sumimoto K, Fukui Y, Sakaguchi Y, Ikeura T, Shimatani M, Fukui T, Matsushita M, Takaoka M, Nishio A, Okazaki K. Regulatory T cells in type 1 autoimmune pancreatitis. *Int J Rheumatol*. 2012;2012:795026.
- [124] Umemura T, Ota M, Hamano H, Katsuyama Y, Kiyosawa K, Kawa S. Genetic association of Fc receptor-like 3 polymorphisms with autoimmune pancreatitis in Japanese patients. *Gut*. 2006 Sep;55(9):1367-8.

- [125] Umemura T, Ota M, Hamano H, Katsuyama Y, Muraki T, Arakura N, Kawa S, Kiyosawa K. Association of autoimmune pancreatitis with cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms in Japanese patients. *Am J Gastroenterol.* 2008 Mar;103(3):588-94.
- [126] Urosevic N, Silvia OJ, Sangster MY, Mansfield JP, Hodgetts SI, Shellam GR. Development and characterization of new flavivirus-resistant mouse strains bearing Flv(r)-like and Flv(mr) alleles from wild or wild-derived mice. *J Gen Virol.* 1999 Apr;80 (Pt 4):897-906.
- [127] Valet G. Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2003 Jul-Sep;17(3):213-22.
- [128] van der Neut Kolfschoten M, Schuurman J, Losen M, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science.* 2007;317:1554–57.
- [129] Walseng E, Furuta K, Bosch B, Weih KA, Matsuki Y, Bakke O, Ishido S, Roche PA. Ubiquitination regulates MHC class II-peptide complex retention and degradation in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 23;107(47):20465-70.
- [130] Warren SJ, Arteaga LA, Rivitti EA, Aoki V, Hans-Filho G, Qaqish BF, Lin MS, Giudice GJ, Diaz LA. The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol.* 2003;120:104–8.
- [131] Watanabe T, Yamashita K, Sakurai T, Kudo M, Shiokawa M, Uza N, Kodama Y, Uchida K, Okazaki K, Chiba T. Toll-like receptor activation in basophils contributes to the development of IgG4-related disease. *J Gastroenterol.* 2013 Feb;48(2):247-53.
- [132] Watanabe T, Yamashita K, Arai Y, Minaga K, Kamata K, Nagai T, Komeda Y, Takenaka M, Hagiwara S, Ida H, Sakurai T, Nishida N, Strober W, Kudo M. Chronic Fibro-Inflammatory Responses in Autoimmune Pancreatitis Depend on IFN- α and IL-33 Produced by Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Immunol.* 2017 May 15;198(10):3886-3896.

- [133] Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet.* 1996 Oct;14(2):141-5.
- [134] Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology.* 2007;132:1557–73.
- [135] Witt H, Luck W, Becker M, Böhmig M, Kage A, Truninger K, Ammann RW, O'Reilly D, Kingsnorth A, Schulz HU, Halangk W, Kielstein V, Knoefel WT, Teich N, Keim V. Mutation in the SPINK1 trypsin inhibitor gene, alcohol use, and chronic pancreatitis. *JAMA.* 2001 Jun 6;285(21):2716-7.
- [136] Witt H, Sahin-Tóth M, Landt O, Chen JM, Kähne T, Drenth JP, Kukor Z, Szepessy E, Halangk W, Dahm S, Rohde K, Schulz HU, Le Maréchal C, Akar N, Ammann RW, Truninger K, Bargetzi M, Bhatia E, Castellani C, Cavestro GM, Cerny M, Destro-Bisol G, Spedini G, Eiberg H, Jansen JB, Koudova M, Rausova E, Macek M Jr, Malats N, Real FX, Menzel HJ, Moral P, Galavotti R, Pignatti PF, Rickards O, Spicak J, Zarnescu NO, Böck W, Gress TM, Friess H, Ockenga J, Schmidt H, Pfützer R, Löhr M, Simon P, Weiss FU, Lerch MM, Teich N, Keim V, Berg T, Wiedenmann B, Luck W, Groneberg DA, Becker M, Keil T, Kage A, Bernardova J, Braun M, Güldner C, Halangk J, Rosendahl J, Witt U, Treiber M, Nickel R, Férec C. A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2006 Jun;38(6):668-73.
- [137] Working Group IAP/APA Acute Pancreatitis Guidelines. IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis. *Pancreatology.* 2013 Jul-Aug;13(4 Suppl 2):e1-15.
- [138] Wu BU, Johannes RS, Sun X, Tabak Y, Conwell DL, Banks PA. The early prediction of mortality in acute pancreatitis: a large population-based study. *Gut* 57:1698–1703.
- [139] Wu C, Liu C, Luo K, Li Y, Jiang J, Yan F. Changes in Expression of the Membrane Receptors CD14, MHC-II, SR-A, and TLR4 in Tissue-Specific Monocytes/Macrophages Following *Porphyromonas gingivalis*-LPS Stimulation. *Inflammation.* 2017 Nov 18.

- [140] Xu LL, Warren MK, Rose WL, Gong W, Wang JM. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *J Leukoc Biol.* 1996 Sep;60(3):365-71.
- [141] Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2013 Jun;144(6):1252-61.
- [142] Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med.* 2003 Jul 21;198(2):235-47.
- [143] Yin Q, Jiang D, Li L, Yang Y, Wu P, Luo Y, Yang R, Li D. LPS Promotes Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation Through the TLR4/Rac1/Akt Signalling Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2017 Dec 13;44(6):2189-2200.
- [144] Yoshida K, Toki F, Takeuchi T, Watanabe S, Shiratori K, Hayashi N. Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci.* 1995;40:1561–8.
- [145] Zhang H, Neuhöfer P, Song L, Rabe B, Lesina M, Kurkowski MU, Treiber M, Wartmann T, Regnér S, Thorlacius H, Saur D, Weirich G, Yoshimura A, Halangk W, Mizgerd JP, Schmid RM, Rose-John S, Algül H. IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality. *J Clin Invest.* 2013;123:1019–1031.
- [146] Zhao ZH, Hu LH, Ren HB, Zhao AJ, Qian YY, Sun XT, Su S, Zhu SG, Yu J, Zou WB, Guo XR, Wang L, Li ZS, Liao Z. Incidence and risk factors for post-ERCP pancreatitis in chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc.* 2017 Jan 4. pii: S0016-5107(16)30897-5.
- [147] Zhou Y, Tung HY, Tsai YM, Hsu SC, Chang HW, Kawasaki H, Tseng HC, Plunkett B, Gao P, Hung CH, Vonakis BM, Huang SK. Aryl hydrocarbon receptor controls murine mast cell homeostasis. *Blood.* 2013 Apr 18;121(16):3195-204.

- [148] Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):e74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558. Epub 2010 Jul 13.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIP	Autoimmune Pankreatitis
AP	Akute Pankreatitis
APACHE	<i>Acute Physiology And Chronic Health Examination</i>
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BISAP	<i>Bedside Index of Servery of Acute Pancreatitis</i>
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CA	Karboanhydrase
Ca ²⁺	Kalzium
CASR	<i>calcium-sensing receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDC	konventionelle dendritische Zellen
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Clec4a2	<i>C-type lectin domain family 4</i>
Cl ⁻	Chlorid
CP	Chronische Pankreatitis
CrP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
CTRC	Chymotrypsin C
Cxcl-1	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
Cxcl-5	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 5</i>
Cytip	<i>cytohesin 1 interacting protein</i>
DC	Dendritische Zellen
DCIR	<i>dendritic cell immunoreceptor</i>
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DMT1	Diabetes mellitus Typ 1

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERCP	endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
EZM	Extrazellulärmatrix
ff.	folgende
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCRL3	<i>Fc-receptor like 3</i>
FCS	<i>forward scatter</i>
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
Galnt5	<i>galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5</i>
GEL	granulozytäre epitheliale Läsionen
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
Hkt	Hämatokrit
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HPRT	<i>hypoxanthin phosphoribosyl transferase</i>
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
ICDC	<i>international consensus diagnostic criteria</i>
ICOS	<i>Inducible T-cell COStimulator</i>
IDCP	idiopathische dukt-zentrische Pankreatitis
IFN- α	Interferon α
IFN- γ	Interferon γ
IgE	Immunglobulin E
IgG ₄	Immunglobulin G ₄
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IL-10R2	IL-10 Rezeptor Typ 2
IL-12	Interleukin 12

IL-13	Interleukin 13
IL-18	Interleukin-18
IL-33	Interleukin-33
IRD	<i>IgG₄-related disease</i>
IRF	<i>Interferone regulatory Factor</i>
i.S.	im Serum
JAK	Januskinase
KCNA3	<i>Potassium voltage-gated channel, member 3</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LF	Laktoferrin
LPS	Lipopolysaccharid
LPSP	lymphoplasmazytäre sklerosierende Pankreatitis
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MRCP	Magnetresonanzcholangiopankreaticographie
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
myD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
n	Anzahl
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBP	Plasminogen-bindendes Protein
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Pankreaskarzinom
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
PFB	Pankreatische Fibroblasten
PI(P)-3	Phosphatidylinositol-3(-Phosphat)
PJS	<i>Japanese Pancreas Society</i>
PP	Pankreatischen Polypeptid
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PSTI	<i>pancreatic secretory trypsin inhibitor</i>
PSZ	pankreatische Sternzellen

QTL	<i>quantitative trait locus</i>
qRT-PCR	<i>quantitative-Real-Time-PCR</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
RCIPD	<i>Research Committee of Intractable Pancreatic Diseases</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
s.	siehe
S.	Seite
s.o.	siehe oben
SPF	spezifisch Pathogen-frei
SPINK-1	Serin-Proteasen-Inhibitor Kasaltyp 1
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF- α	<i>transforming growth factor α</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tregs	T-regulatorische Zellen
TREM2	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells</i>
u.a.	unter anderem
UBR2	Ubiquitin-Protein Ligase
US	Ultraschall
ÜS	Überstand
γ -GT	γ -Glutamyltransferase
z.B.	zum Beispiel
ZS	Zellsuspension

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 A:	Ontologie humaner DCs.....	12
Abbildung 1 B:	Klassifikation humaner DCs anhand ihrer relativen IRF4- und IRF8-Expression	12
Abbildung 2:	Hypothetische Pathogenese der autoimmunen Pankreatitis (AIP) und IgG4-bedingter Erkrankungen	17
Abbildung 3:	Prinzip des LEGENDplex™ Assay	27
Abbildung 4:	Beispielhafte Darstellung einer RNA-Gelelektrophorese.....	30
Abbildung 5 A:	Einfluss unterschiedlicher GM-CSF- und LPS-Konzentrationen auf die DNA-Synthese der cDCs	34
Abbildung 5 B:	Einfluss von LPS auf die DNA-Syntheserate der cDCs unter höchster Wachstumsfaktor-Stimulation	34
Abbildung 6 A/B:	Charakterisierung von cDCs via Durchflusszytometrie: Ko-Expression von CD11c und CD40	36
Abbildung 7 A/B:	Charakterisierung von cDCs via Durchflusszytometrie: Ko-Expression von CD11c und CD80	37
Abbildung 8 A/B:	Charakterisierung von cDCs via Durchflusszytometrie: Ko-Expression von CD11c und CD83	38
Abbildung 9 A/B:	Charakterisierung von cDCs via Durchflusszytometrie: Ko-Expression von CD11c und CD86	39
Abbildung 10 A/B:	Charakterisierung von cDCs via Durchflusszytometrie: Ko-Expression von CD11c und MHC-II	40
Abbildung 11:	LPS-Effekte auf die IL-12-Konzentrationen in cDC-Kulturüberständen	42
Abbildung 12:	LPS-Effekte auf die IL-10-Konzentrationen in cDC-Kulturüberständen	43
Abbildung 13:	LPS-Effekte auf die MCP-1-Konzentrationen in cDC-Kulturüberständen	44
Abbildung 14:	Gen-Expressionsprofile <i>in vitro</i> generierter cDCs	46
Abbildung 15:	Hypothetische Betrachtung der potenziellen Rolle von MRL/MpJ-cDCs in der Pathogenese der murinen AIP	59

Anhang

Material

Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Eismaschine (AF 10)	Scotsman
Feinanalysenwaage (Chyobalance JL 200)	Dynatech
Heizblock (Test Tube Heater SHT1)	Stuart Scientific
Heizblock (Thermomixer Comfort)	Eppendorf
Inkubator (HeraCell 150)	Thermo Scientific
Magnetrührer (MR 2002)	Heidolph
Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 25)	ZEISS
PipetBoy accu	IBS
Pipetten (Research 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf
Schüttler	CAT
Schüttler (Rocky® 3D)	Fröbel Labortechnik
TaqMan-Reader (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System)	Applied Biosystems
Vortexer (MS2 Minishaker)	IKA Works Inc.
Wasserbad (1083)	GFL
Zentrifuge (5415D)	Eppendorf
Zentrifuge (Galaxy 16DH)	VWR
Zentrifuge (Labofuge 400R)	Heraeus
Zentrifuge (MIKRO 200R)	Hettich
Zentrifuge (Rotina 46R)	Hettich
Begasungsbrutschrank	Heraeus
Gelelektrophoresekammer	BioRad

Allgemeines Verbrauchsmaterial

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
0,2 ml 96-Well Multiply® PCR- Platte & Adhesive Covers	Sarstedt
15 ml und 50 ml Tubes	Greiner
6-well Kulturplatten	Greiner, BD Falcon
96-well-half-area Mikrotiterplatten	BD Falcon
Deckgläschen	Roth
Dual Filter Tips 0,1– 1000 µl	Eppendorf
Objektträger	Marienfeld
Reaktionsgefäße 0,6; 1,5; 2,0; 5,0 ml	Eppendorf
Pipettenspitzen 0,1– 1000 µl	Eppendorf
Sterile Pipetten 5, 10 und 25 ml	Greiner

Chemikalien/Reagenzien

Allgemein

<u>Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>
PBS (10x <i>posphate buffered saline</i>), pH 7,4	Gibco
Ethanol	Apomix
Isopropanol	J.T. Baker

Zellkultur

<u>Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>
Trypsin-EDTA (0,05 % in PBS)	Gibco
FKS (Fetales Kälberserum)	Invitrogen
RPMI Medium (1x)	Biochrom
Penizillin-Streptomycin Stammlösung (100x)	Gibco
Trypanblau	Gibco

Zellproliferations/Wachstums-Assay (BrdU)

<u>Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>
BrdU-(5-Bromo-2'-Deoxyuridin)-Zellproliferations-ELISA	Roche
1 M H ₂ SO ₄	Merck

Nukleinsäureanalytik

<u>Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>
peqGOLD TriFast™	PEQLAB
Chloroform	J.T. Baker
DEPC-H ₂ O (<i>Aqua bidest.</i> mit 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich
DNase-Kit (DNA-free™ DNase Treatment&Removal)	Ambion
RT-Kit (High Capacity cDNA Reverse-Transcription Kit)	Applied Biosystems
TaqMan-Master Mix (Universal PCR Master Mix, No AmpErase®)	Applied Biosystems
„Assay on demand“ Clec4a2	Applied Biosystems
„Assay on demand“ HPRT	Applied Biosystems
„Assay on demand“ Galnt5	Applied Biosystems
„Assay on demand“ TREM2	Applied Biosystems
„Assay on demand“ Cytip	Applied Biosystems

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit zum Thema:

„*In vitro* Studien zur Rolle dendritischer Zellen im MRL/MpJ-Mausmodell der chronischen Pankreatitis“

selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken oder Wortlauten oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens“ an der Universität Rostock angefertigt habe.

Rostock, den 16.03.2018

Erik Volmer

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen denjenigen recht herzlich bedanken, die mir während der Anfertigung dieser Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen.

Besonderer Dank gilt dabei Herrn Professor Dr. med. habil. Robert Jaster, durch den ich überhaupt erst die Möglichkeit bekam mich innerhalb seiner Arbeitsgruppe mit diesem interessanten Thema zu beschäftigen und der mir mit seinen ausführlichen Hinweisen und Korrekturanmerkungen der ersten Skripte zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe des gastroenterologischen Forschungslabors ganz herzlich für ihre fachliche Unterstützung und Ausdauer bedanken.

Dabei gilt ein großer Dank Frau Dr. rer. nat. Sarah Rohde, die mich stets bei der praktischen Umsetzung zellbiologischer und biochemischer Experimente unterstützte und mir mit ihren Anmerkungen bei der Einarbeitung in die Methoden der Molekularbiologie sowie bei etwaigen Problemen tatkräftig zur Seite stand.

In gleicher Form möchte ich mich auch bei Frau M.Sc. Luise Ehlers und Frau Katja Bergmann bedanken, die mir ebenfalls bei der Einarbeitung in die Methodenkomplexe geholfen und mich jederzeit unterstützt haben.